

Systematische Entwicklung von GIST-Modellen und Untersuchung von DOG1 bei GIST

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Susanne Grunewald

aus Essen

Datum der Abgabe: April 2014

Aus Inhalten dieser Arbeit entstand folgende Veröffentlichung:

Simon S, Grabellus F, Ferrera L, Galiotta L, Schwindenhammer B, Mühlenberg T, Taeger G, Eilers G, Treckmann J, Breitenbuecher F, Schuler M, Taguchi T, Fletcher JA and Bauer S. DOG1 regulates growth and IGFBP5 in gastrointestinal stromal tumors (2013). *Cancer Res*, **73**, 3661-3670.

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Inneren Klinik (Tumorforschung), in der Arbeitsgruppe „Translationale Sarkomforschung“ am Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. S. Bauer
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Jendrossek

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. S. Knauer

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1 Gastrointestinale Stromatumoren	5
1.2 Präklinische Modelle für GIST	10
1.3 DOG1 (Discovered on GIST 1)	12
1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Materialien und Geräte.....	15
2.2 Zelllinien.....	21
2.3 Zellkulturmedien.....	21
2.4 Gebrauchslösungen	22
2.5 Methoden	25
2.5.1 Zellkultur	25
2.5.2 Zytotoxizitätsbestimmung (Sulforhodamin B-Assay)	25
2.5.3 Proteinanalyse.....	26
2.5.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analysen)	28
2.5.5 Molekularbiologische Methoden nach Sambrock <i>et al.</i>	29
2.5.6 <i>In vivo</i> / Tierversuche.....	35
2.5.7 Expressions-Arrays und SNP-Arrays.....	37
2.5.8 <i>Whole-Cell-Patch-Clamp</i> -Technik.....	37
3. Ergebnisse.....	38
3.1 Etablierung von GIST-Xenograftmodellen.....	38
3.1.1 Etablierung von GIST-Xenograftmodellen aus Patientenmaterial.....	38
3.2.1 Etablierung von GIST-Xenograftmodellen aus GIST-Zelllinien	43
3.3 Etablierung neuer isogener Sublinien der GIST-T1 Zelllinie (<i>in vitro</i>).....	48
3.3.1. Etablierung eines Modells der genomischen Heterogenität bei GIST.....	49

3.4 Untersuchung von DOG1 als therapeutische Zielstruktur	52
3.4.1 KIT und DOG1 sind coexprimiert in GIST-Zelllinien.....	52
3.4.2 DOG1-Knockdown hat keinen Effekt auf KIT-Expression, Zellproliferation oder Imatinib-Sensitivität von GIST-Zellen <i>in vitro</i>	53
3.4.3 Biochemische Inhibitoren von calciumaktivierten Chloridkanälen haben keinen Effekt auf die Zellproliferation von GIST-Zellen <i>in vitro</i>	55
3.4.4 DOG1-Knockdown inhibiert das Wachstum von GIST-T1-Xenografts	56
3.4.5 Genexpressionsanalysen: IGFBP5 in DOG1-negativen Zellen und Xenografttumoren hochreguliert	58
3.4.6 Überexpression von IGFBP5 hat weder einen Effekt auf die Zellproliferation oder auf die Imatinib-Sensitivität von GIST-Zellen <i>in vitro</i> noch auf das Tumorwachstum <i>in vivo</i>	63
4. Diskussion	67
4.1 Etablierung neuer GIST-Modelle	67
4.2 Untersuchung von DOG1 als therapeutische Zielstruktur	72
5. Zusammenfassung	77
5.1 Summary (Zusammenfassung in englischer Sprache).....	78
6. Abkürzungsverzeichnis	79
7. Abbildungsverzeichnis	80
8. Tabellenverzeichnis	84
9. Literaturverzeichnis.....	85
10. Anhang	92

1. Einleitung

1.1 Gastrointestinale Stromatumoren

Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) gehören zur Gruppe der Weichteilsarkome und sind die am häufigsten vorkommenden mesenchymalen Tumoren im Gastrointestinaltrakt. Sie machen ca. 5 % aller Sarkome aus und zählen mit deutschlandweit ca. 800-1.200 Neuerkrankungen zu den seltenen Tumoren. Charakteristisch für GIST sind aktivierende Mutationen der Typ-III-Rezeptortyrosinkinasen *KIT* oder *Platelet-derived growth factor receptor alpha* (*PDGFR-α*) (Heinrich et al. 2003b; Hirota et al. 1998; Rubin et al. 2001). Bei etwa 85 % aller Patienten finden sich Mutationen in diesen Genen (Corless et al. 2004). Lokalisiert sind die Tumoren am häufigsten im Magen (50-60 %) und Dünndarm (20-30 %), seltener im Kolon und Rektum (10 %), Ösophagus (2-5 %) und Peritoneum (2-5 %) (Miettinen and Lasota 2001).

Für resektable Tumoren stellt die vollständige operative Tumorentfernung die primäre Standardtherapie dar (Blay et al. 2005). Zytostatische Chemotherapien, die bei anderen Sarkomen zum Einsatz kommen, haben sich bei GIST als unwirksam erwiesen (Dematteo et al. 2002). Die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate für Patienten mit lokalisierter GIST-Erkrankung lag vor Einführung des niedermolekularen Kinase-Inhibitors Imatinib (Handelsname Glivec®) bei 50 % (Dematteo et al. 2000). Zu den wichtigsten Prognosefaktoren zählen dabei die Tumorgroße, die Zahl der Mitosen sowie die anatomische Primärlokalisation. Seit der Einführung von Imatinib liegt die 5-Jahres-Überlebensrate selbst bei Hochrisiko-Kollektiven bei 92 % (Joensuu et al. 2012). Mehr als 80 % der Patienten mit metastasierten GIST sprechen im Median für 27 Monate auf eine Therapie mit Imatinib an. Das mediane Überleben von Patienten mit metastasierten GIST konnte von 18 Monaten auf mehr als 5 Jahre gesteigert werden (Demetri et al. 2002; Verweij et al. 2004).

Trotz teilweise dramatischer Remissionen entwickelt der Großteil der Patienten (80-90 %) im Verlauf der Therapie eine sekundäre Resistenz gegenüber Imatinib. Zu den wichtigsten Resistenzmechanismen scheint dabei die Selektion von GIST-Klonen mit sekundären Resistenzmutationen im *KIT*-Gen zu gehören (Debiec-Rychter et al. 2005). In einigen Fällen wurden auch *KIT*-Amplifikationen sowie der sekundäre

Verlust der KIT-Expression beobachtet (Heinrich et al. 2006).

Das *KIT*-Gen wurde erstmals als virales Onkogen in Sarkomen junger Katzen gefunden und nach dem englischen Wort *kitten* sowie dem damit assoziierten Virus benannt (Besmer et al. 1986). Das aus 19 Exonen bestehende humane Homolog wurde entsprechend „v-kit Hardy-Zuckermann 4 feline sarcoma viral oncogene homolog“ genannt und liegt auf Chromosom 4 (4q11-q12) (Yarden et al. 1987).

Das Genprodukt von KIT (CD117) ist ein 145kDA schweres membranständiges Glycoprotein, das aus einer extrazellulären Rezeptordomäne (bestehend aus 5 IgG-ähnlichen Domänen), einer juxtamembranösen Domäne (JMD) und einer zweigeteilten Kinase-Domäne (KD) aufgebaut ist. In inaktiver Form liegt KIT als Monomer vor, das erst nach Bindung des KIT-Liganden (Stammzellfaktor (SCF)) dimerisiert und dann autophosphoryliert wird (Abb.1). Konsekutiv kommt es zu einer Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, die insbesondere den PI3K und den Ras/Raf/MAPK-Signalweg einschließen (Abb. 2) (Zhang et al. 2000) (Linnekin 1999).

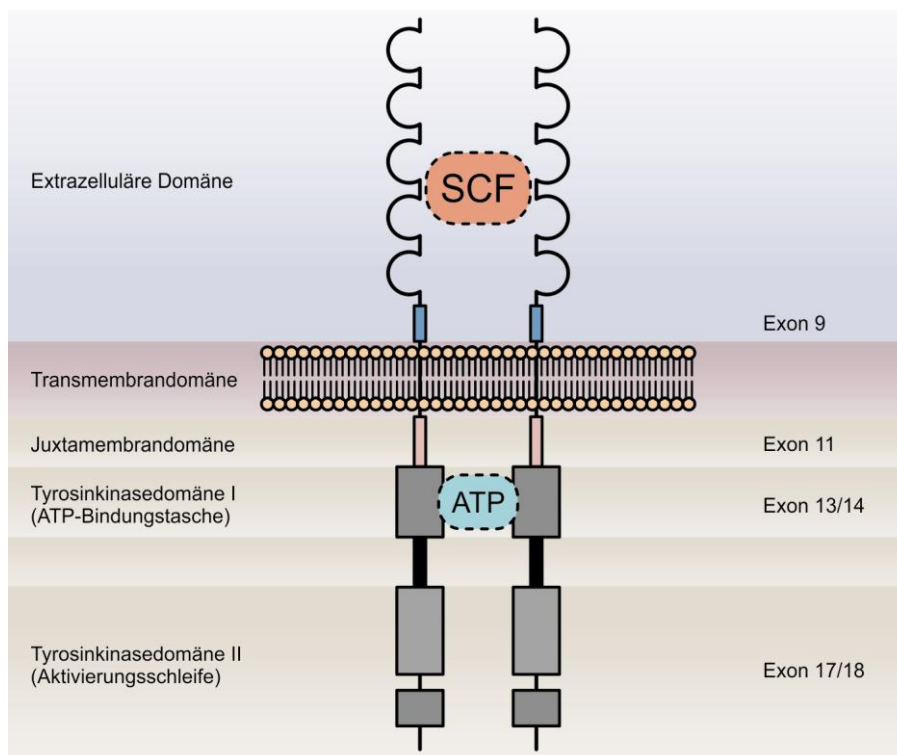


Abbildung 1: Schematische Darstellung des dimersierten KIT-Rezeptors.

Physiologisch spielt KIT eine Rolle bei verschiedenen biologischen Prozessen wie der Proliferation von Keimzellen (Loveland and Schlatt 1997), der Migration von

Melanozyten (Mackenzie et al. 1997), den Schrittmacherzellen des Gastrointestinaltrakt (Cajalzellen bzw. Interstitielle Zellen von Cajal/ICC) (Ward et al. 1994), sowie der Entwicklung/Differenzierung verschiedener Zelltypen z.B. hämatopoetischer Zellen und Mastzellen. Mäuse mit inaktivierenden Keimbahnmutationen von KIT weisen entsprechend eine veränderte Fellfarbe, Infertilität, Anämien sowie Motilitätsstörungen im Darm auf (Nakai et al. 2008).

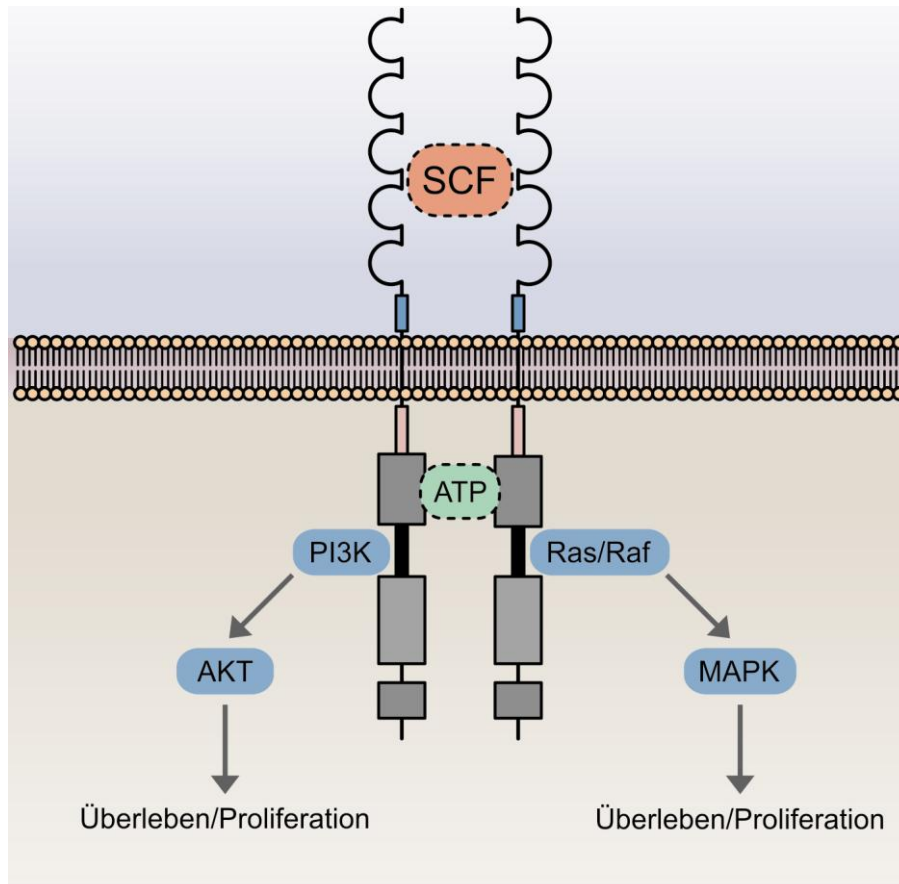


Abbildung 2: Nach Phosphorylierung von KIT werden verschiedene Signalwege aktiviert, die zur Proliferation der Zelle führen. Über die PI3-Kinase wird unter anderem die AKT-Kinase (Proteinkinase B; PKB) aktiviert und über den Ras/Raf Signalweg wird die MAPK-Kaskade in Gang gesetzt (Linnekin 1999).

Bei GIST kommt es durch Mutationen im *KIT*-Gen zu einer konstitutiven Liganden-unabhängigen Aktivierung des KIT-Rezeptors. Am häufigsten betroffen sind davon Exon 11 (Juxtamembrandomäne) mit 67 % und Exon 9 (extrazelluläre Rezeptordomäne) mit 18 %. Selten finden sich primäre Mutationen in der Kinasedomäne (Exon 13/14 und Exon 17/18) (Heinrich et al. 2003a).

Bei 10-15 % der im Erwachsenenalter auftretenden und bei 85 % der pädiatrischen GIST finden sich keine Mutationen im *KIT*- oder *PDGFRA*-Gen (Corless et al. 2004). Die Gruppe der „Wildtyp-GIST“ weisen sowohl pathogenetisch als auch klinisch Unterschiede gegenüber GIST mit KIT/PDGFR-Mutationen auf. Es gibt drei GIST-assoziierte Syndrome, die Carney-Triade, das Carney-Stratakis-Syndrom und die Neurofibromatose-1 (Morbus von Recklinghausen). Die Syndrom-assoziierten GIST treten im Gegensatz zu sporadischen GIST häufig multifokal auf (Stratakis and Carney 2009; Bajor 2009). Außerdem konnte eine Gruppe von nicht Syndrom-assoziierten GIST identifiziert werden, die inaktivierende Mutationen im Succinat-Dehydrogenase-Komplex aufweisen (Janeway et al. 2011). Bei einer kleinen Subgruppe von Patienten mit „Wild-Typ“-GIST wurden kürzlich onkogene BRAF-Mutationen (V600E) nachgewiesen (Johansson et al. 2007). Aufgrund der Verfügbarkeit potenter BRAF-Inhibitoren könnte dies für diese Patienten therapeutisch von Bedeutung sein (Hostein et al. 2010).

Imatinib wurde ursprünglich für die Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) entwickelt, die ähnlich wie GIST durch eine pathologisch aktivierte Tyrosinkinase (BCR-ABL) charakterisiert ist. Bei fast 90 % der CML-Patienten konnte durch den niedermolekularen Hemmstoff Imatinib eine komplette zytogenetische Remission erzielt werden (Hehlmann et al. 2007). Durch Imatinib lässt sich bei GIST-Patienten in 5 % eine komplette, bei 47 % eine partielle Remission und bei 32 % eine lang anhaltende Stabilisierung erzielen (Verweij et al. 2004). Interessanterweise ist die Remission in diesem Zusammenhang nicht prädiktiv für eine bessere progressionsfreie Zeit (Demetri et al. 2013; Blanke et al. 2008). Das Ansprechen der Patienten korreliert außerdem mit der Lokalisation der Primärmutation: 83,5 % der Patienten mit Exon 11 Mutation sprechen auf die Imatinib-Therapie an, Patienten mit einer Exon 9 Mutation nur zu 47,8 %, Patienten ohne Mutation zeigen kein Ansprechen auf Imatinib (Heinrich et al. 2003a).

Imatinib hemmt KIT durch Bindung an die ATP-Bindungstasche, wenn der Rezeptor in seiner inaktiven Form vorliegt, wodurch die Phosphorylierung verhindert wird und die inaktive Konformation stabilisiert wird (Mol et al. 2004).

Bei Patienten mit sekundärer Resistenz gegenüber Imatinib finden sich in den meisten Fällen sekundäre Mutationen von KIT, die hauptsächlich in der

Kinasedomäne (ATP-Bindungstasche Exon 13/14 und Aktivierungsschleife Exon 17/18) auftreten (Heinrich et al. 2006). Die Sekundärmutationen in der ATP-Bindungstasche (Exon 13/14) führen zu einer Konformationsänderung von KIT und inhibieren so direkt die Bindung von Imatinib (Corless et al. 2011a).

Sekundärmutationen in der Aktivierungsschleife (Exon 17/18) inhibieren Imatinib indirekt, indem die aktive Form des Rezeptors stabilisiert wird (Tamborini et al. 2006; Gajiwala et al. 2009).

Nach Imatinib-Versagen steht mit Sunitinib (Handelsname Sutent®) ein zweiter zugelassener Tyrosinkinase-Inhibitor zur Verfügung. Im Rahmen einer Placebo-kontrollierten Studie konnte gezeigt werden, dass Sunitinib das progressionsfreie Überleben um mehr als 20 Monate verlängert (Demetri et al. 2006). Insbesondere Patienten mit Exon 9 Mutationen sowie Patienten mit Tumoren mit Mutationen in der Kinasedomäne (Exon13/14) scheinen von der Therapie mit Sunitinib zu profitieren (Heinrich et al. 2008a). Gegenüber Sekundärmutationen in Exon 17 ist Sunitinib nur schwach wirksam, da Sunitinib nur das inaktive KIT bindet. Mutationen in der Aktivierungsschleife führen allerdings zu einer konstitutiv aktivierten Konformation von KIT (Gajiwala et al. 2009; Heinrich et al. 2008a).

Erschwerend für eine erfolgreiche Therapie ist nicht nur das Fehlen wirksamer Medikamente gegen spezielle Mutationen, sondern auch die genomische Heterogenität bei GIST. Durch Analysen verschiedener Metastasen von Patienten mit resistenten GIST konnte gezeigt werden, dass sich innerhalb eines Patienten häufig eine Vielzahl verschiedener Sekundärmutationen nachweisen lässt (Wardelmann et al. 2005).

Bislang ist die Entwicklung eines gegen das gesamte Spektrum sekundärer KIT-Mutationen wirksamen direkten KIT-Inhibitors nicht gelungen. Daher werden aktuell Kombinationsstrategien oder Sequenz-Therapien klinisch untersucht. Diesbezüglich kommt der Entwicklung präklinischer Resistenzmodelle eine Schlüsselrolle bei der Identifikation neuer Inhibitoren oder medikamentöser Strategien zu.

Ogleich die KIT-Kinase auch bei sehr fortgeschrittenen GIST eine wichtige onkogene Rolle übernimmt, lassen sich KIT-Mutationen schon bei kleinsten, klinisch gutartigen „Mikro-GIST“ nachweisen. Diese sogenannten „GISTlets“ konnten von mehreren Arbeitsgruppen bei der Analyse von Gastrektomien oder Autopsien in

jedem dritten Magen gefunden werden (Kawanowa et al. 2006; Abraham et al. 2007). Zusätzliche genetische Ereignisse müssen daher zur genetischen Progression von *low-risk* zu *high-risk* oder metastasierten GIST beitragen. Angesichts der geringen Rate kompletter pathologischer Remissionen unter Imatinib, scheint daher die Identifikation KIT-unabhängiger onkogener Faktoren für die Heilung von GIST-Patienten erforderlich zu sein.

1.2 Präklinische Modelle für GIST

Es konnten bislang nur vier KIT-positive humane GIST-Zelllinien etabliert werden. Drei dieser GIST-Zelllinien, GIST882, GIST48 und GIST430, stammen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J.A. Fletcher (Brigham and Women's Hospital, Boston, USA). Die vierte Zelllinie, GIST-T1, stammt aus dem Labor von Dr. T. Taguchi (Kochi University, Nankoku, Kochi, Japan).

Alle Zelllinien wurden aus operativ entferntem humanem Tumorgewebe etabliert, wachsen adhärent, haben eine spindelförmige Morphologie und wurden nicht künstlich immortalisiert. GIST882 stammt von einem Patienten mit metastasiertem GIST. GIST882 Zellen haben eine primäre Exon 13 KIT-Mutation (K642E) und sind Imatinib-sensibel (Tuveson et al. 2001). Diese Zelllinie kann als Modell für primär unbehandelte GIST dienen, allerdings ist eine primäre Mutation in Exon 13 klinisch sehr selten (2 %) (Heinrich et al. 2003a). Die beiden Zelllinien GIST48 und GIST430 stammen von GIST-Patienten, die im späteren Verlauf ihrer Imatinib-Therapie einen Progress erlitten haben. GIST48 hat eine primäre Exon 11 Punktmutation (V560D) und eine sekundäre Exon 17 Punktmutation (D820A) in der Aktivierungsschleife. GIST430 hat ebenfalls eine primäre Exon 11 Mutation, eine 51 Basenpaar Deletion, und eine sekundäre Exon 13 Punktmutation V654A (Bauer et al. 2006). Diese beiden Zelllinien repräsentieren die klinische Situation nach Versagen einer Imatinib-Therapie. Außerdem wurden mittels Selektion von diesen drei Zelllinien KIT-negative, isogene Sublinien kultiviert.

GIST-T1 stammt ebenfalls von einem metastasiertem GIST und hat eine primäre Exon 11 Deletion (57bp) (Taguchi et al. 2002). Unabhängig voneinander gelang es zwei amerikanischen Arbeitsgruppen (Prof. Dr. J.A. Fletcher (Brigham and Women's

Hospital, Boston, USA)) und Prof. Dr. B.P. Rubin (Cleveland Clinic, Cleveland, USA)) durch dauerhafte Kultivierung der GIST-T1 Zellen in Imatinib-haltigem Medium isogene Sublinien zu generieren. So entstanden eine GIST-T1 Sublinie, die zusätzlich zu der primären Exon 11 Deletion, eine sekundären Exon 18 Punktmutation (A829P) (Heinrich et al. 2012) entwickelte und eine Sublinie mit einer sekundären Exon 14 Punktmutation (T670I) (Gupta et al. 2010).

Außerdem existieren noch drei GIST-Zelllinien, die primär KIT-negative sind (GIST5, GIST474 und GIST62) und ebenfalls aus dem Labor von Prof. Dr. J.A. Fletcher stammen.

Neben den humanen GIST-Modellen wurden in den letzten Jahren einige transgene GIST-Modelle entwickelt.

Sommer und Kollegen generierten Knock-in-Mäuse mit einer aktivierenden KIT V558-Deletion. Phänotypisch wiesen heterozygote Tiere GIST-ähnliche Tumoren am Blinddarm und multiple ICC-Hyperplasien im Oesophagus, Magen, Dünndarm und Dickdarm auf (Sommer et al. 2003). Rubin *et al.* und Nakai *et al.* zeigten in ihren Knock-In-Modellen (KIT-Punktmutation K641E und D818Y), dass homozygote Tiere weitaus stärkere ICC-Hyperplasien und deutlich größere GIST-ähnliche Tumoren entwickelten als heterozygote Tiere (Rubin et al. 2005; Nakai et al. 2008). In allen drei Knock-In-Modellen entwickelten die Tiere so starke ICC-Hyperplasien, dass sie nach 10 bis 30 Wochen daran verstarben. Interessanterweise waren die GIST-ähnlichen Tumoren lediglich auf den Blinddarm beschränkt.

Die Knock-in-Modelle zeigen damit große Ähnlichkeit zu den sehr seltenen familiären GIST-Syndromen auf, die auf Keimbahnmutationen von KIT beruhen (Maeyama et al. 2001). Die sporadischen GIST weisen im Gegensatz dazu nahezu immer zusätzliche zytogenetische Aberrationen auf und zwar den Verlust von Chromosomenarmen 1p, 14q, 15q oder 22q (Yang et al. 2008a; Gunawan et al. 2007; Corless et al. 2011b; Ylipaa et al. 2011).

1.3 DOG1 (Discovered on GIST 1)

DOG1 (Synonyme: *ANO1*, *ORAOV2*, *TAOS2*, *TMEM16A*) wurde erstmals 2004 von West und Kollegen in einem cDNA-Microarray als bei GIST spezifisch überexprimiertes Gen gefunden (West et al. 2004) und wird seitdem als GIST-Marker in der Pathologie eingesetzt. GIST weisen zu 95 % immunhistochemisch eine Überexpression von KIT und auch DOG1 auf. Lediglich 3 % aller GIST sind KIT/DOG1 negativ (Miettinen et al. 2009). Mit Hilfe einer DOG-1 Färbung lässt sich auch in 80 % der PDGFRa-mutierten GIST die Diagnose stellen (Espinosa et al. 2008). Mutationen von DOG1 konnten in GIST nicht nachgewiesen werden (Miwa et al. 2008).

DOG1 wird in vielen epithelialen Geweben exprimiert wie z.B. Speicheldrüsen, Pankreas, Magen, Milchdrüsen und Luftröhren (Kunzelmann et al. 2011). Interessanterweise weisen auch die interstitiellen Zellen von Cajal, die als Vorläuferzellen von GIST angesehen werden, eine starke Expression auf (Kindblom et al. 1998; Chen et al. 2007; Gomez-Pinilla et al. 2009).

Das Gen *Ano1* auf Chromosom 11q13 kodiert für das DOG1-Protein und besteht aus 26 Exonen. DOG1 gehört zur Familie der Anoctamine, die aus 10 Mitgliedern (*Ano1-10*) besteht. Die Anoctamine zeigen keinerlei Homologie zu anderen Ionenkanälen und weisen auch untereinander nur einen moderaten Homologiegrad auf, wobei *Ano1* und *Ano2* mit 60 % die höchste Homologie aufweisen. DOG1 und TMEM16B sind calciumaktivierte Chloridkanäle (CaCCs) (Schroeder et al. 2008; Yang et al. 2008b; Stephan et al. 2009).

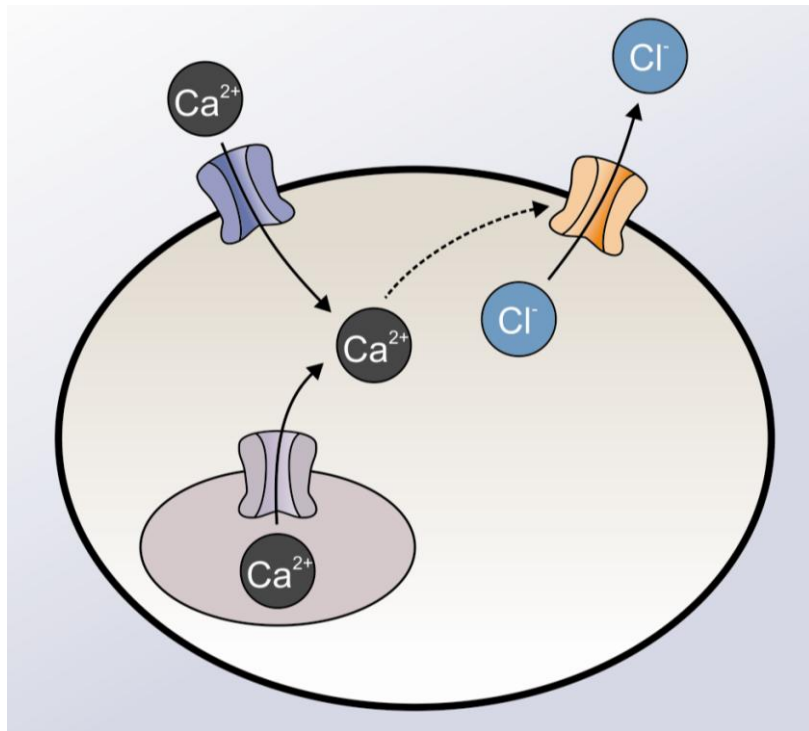


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Chloridflux durch CaCCs.

Der calciumaktivierte Chloridkanal ist ein durch intrazelluläres Calcium gesteuerter Anionenkanal. Der intrazelluläre Calciumanstieg, der für eine Kanal-Aktivierung nötig ist, erfolgt entweder über die Ausschüttung intrazellulärer Calciumspeicher oder über den Influx durch Plasmamembrankanäle. Zudem können CaCCs durch Depolarisation des Membranpotenzials reguliert werden (Abb.3) (Hartzell et al. 2005).

Die Tertiärstruktur des DOG1-Proteins besteht aus acht Transmembrandomänen mit intrazellulären NH_2 - und COOH -Enden und einer Pore, welche von der fünften und sechsten Transmembrandomäne geformt wird (Abb.4) (Kunzelmann et al. 2011). Außerdem gibt es mehrere Splicevarianten von DOG1, die die Calciumabhängigkeit von DOG1 beeinflussen können (Ferrera et al. 2009).

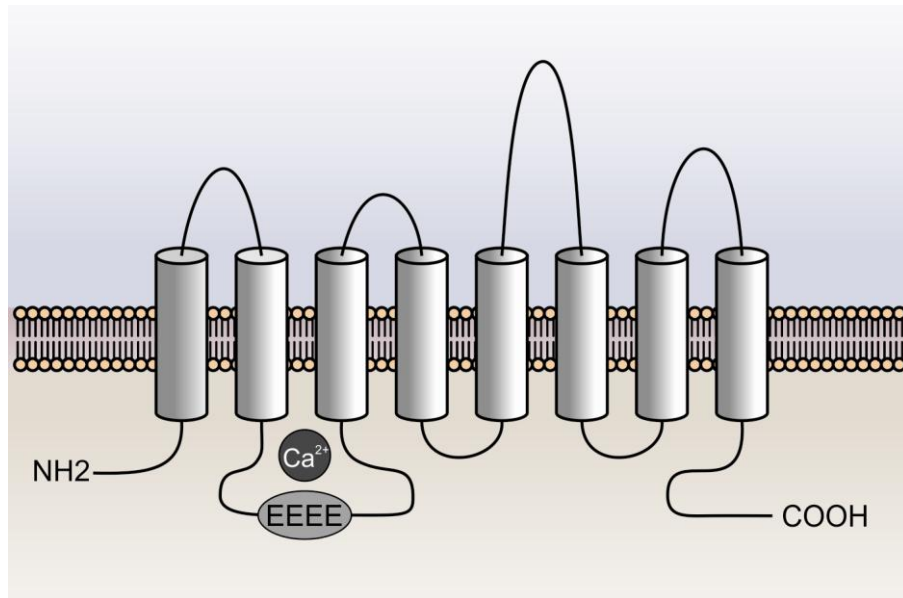


Abbildung 4: Schematische Darstellung des calciumaktivierten Chloridkanals DOG1.

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von GIST-Modellen, die das vorhandene Spektrum der GIST-Modelle erweitern und die klinische Realität der genomischen Heterogenität Imatinib-resistenter GIST besser rekapitulieren.

Als weiteres Ziel sollte die biologische und therapeutische Relevanz von DOG1, einem der wichtigsten diagnostischen Marker für GIST, untersucht werden.

2.Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

6X DNA Loading Dye (Probenpuffer)	Thermo SCIENTIFIC
10x TAE	Invitrogen
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
Ampicillin	Carl Roth
Agarose	Invitrogen
Agar-Agar	Carl Roth
Aprotinin	Sigma Aldrich
Aqua ad iniectabilia Braun	B.Braun Melsungen AG
beta-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Bio-Rad DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories
Bovine Pituitary Extract (BPE)	BD Bioscience
Chloroquin	Sigma Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	AppliChem
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
DNA-Prep® Stain	Beckman Coulter
DNA-Probenpuffer	Thermo SCIENTIFIC
DPBS	Gibco
Ethanol, absolut	Sigma Aldrich
Ethidiumbromidlösung 0,025 %	Carl Roth
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)	Sigma Aldrich
FBS	Biochrom AG
Formalin	Sigma Aldrich

Glukose	B Braun
Glycin	Carl Roth
Hämatoxylin	Sigma Aldrich
Hepes	Sigma Aldrich
Hi-Di-Formamide	Applied Biosystems
Isopropanol	VWR
Kaliumacetat	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth
LB-Medium	Carl Roth
Leupeptin trifluoroacetate salt	Sigma Aldrich
L-Glutamine	Gibco
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich
Methanol	VWR
MITO	BD Bioscience
MOPS	Invitrogen
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich
Natriumfluorid	Sigma Aldrich
Natriumhydrogencarbonat 8,4 %	B.Braun Melsungen AG
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich
Natriummolybdat	Sigma Aldrich
Natriumpyrophosphat	Sigma Aldrich
Natriumvanadat	Sigma Aldrich
NEA non-essential amino acids (100x)	Biochrom AG
Pen-Strep-Ampho (Amphotericin B)	MP Biomedicals
PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluorid)	Sigma Aldrich
Polybren	Santa Cruz

Ponceau S	Sigma Aldrich
Propidiumiodid (DNA PREP Stain)	Beckman Coulter
Protein Ladder Spectra™ Multicolor Broad Range	Thermo SCIENTIFIC
Puromycin	Santa Cruz
<i>Skim Milk Powder</i> (Magermilchpulver)	Fluka
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
Target Retrieval Solution Citrate buffer	Dako
Tris	Carl Roth
TrypLE Express	Gibco
Tween 20	Sigma Aldrich

2.1.2 Zellkulturmaterialien

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Gibco
RPMI 1640	Gibco
DMEM+GlutaMAX	Gibco

2.1.3 Kits

FITC BrdU Flow Kit	BD Biosciences
JETstar Plasmid Purification MIDI Kit	Genomed
MSB Spin PCRapace	Stratec
pcDNA 3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit	Qiagen
Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen

ZytoChem-Plus HRP Polymer Kit	Zytomed Systems
-------------------------------	-----------------

2.1.4 Größenstandards

Protein Ladder Spectra™ Multicolor Broad	Thermo Scientific
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas

2.1.5 Enzyme

alkaline Phosphatase (CIAP)	Thermo Scientific
Restriktionsendonukleasen	Thermo Scientific
RNAse I	Thermo Scientific
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific
Taq DNA Polymerase	5 Prime
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems

2.1.6 Antikörper

Western Blot Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
β-Actin (clone AC15)	1 : 10.000	Sigma Aldrich
AKT	1 : 1000	Cell Signaling
pAKT	1 : 1000	Cell Signaling
DOG1 (clone BV10)	1 : 600	Diagnostic BioSystems
KIT (CD117)	1 : 1000	Dako
pKIT (Tyr703)	1 : 1000	Cell Signaling
MAPK	1 : 1000	Cell Signaling
pMAPK	1 : 1000	Cell Signaling
Cleaved Caspase	1 : 1000	Cell Signaling

IHC-Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
DOG1 (clone SP31)	1 : 100	Zytomed Systems
Ki-67 (Klon K-2)	1 : 2000	Zytomed Systems
KIT	1 : 200	Zytomed Systems

Sekundärantikörper

ECL Anti-rabbit IgG, Horseradish	1 : 2000	GE Healthcare
ECL Anti- mouse IgG From sheep	1 : 1000	GE Healthcare

2.1.7 Plasmide

pLenti CMV GFP Puro	lentivirales Expressionsplasmid
psPAX2	lentiviraler Verpackungsvektor (kodierend für die viralen Proteine gag und pol)
pMD2.G	lentiviraler Verpackungsvektor (kodierend für das virale Protein env)

2.1.8 Hilfsmittel

Plastikmaterial für die Zellkultur wurde ausschließlich von den Firmen Greiner Bioscience, BD (Becton, Dickinson and Company) oder TPP (Techno Plastic Products) verwendet.

Nitrozellulosemembran Hybond-ECL	Amersham Biosciences
NuPAGE 4- 12 % Bis- Tris Gele	Invitrogen

2.1.9 Geräte

Brutschrank Forma 371	Thermo Electron Corporation
Countess® Automated Cell Counter	Life technologies
Dispergiergerät T 10 Basic	IKA-Werke

FACS CXP 500	Beckman Coulter
Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000	Keyence
Gelelektrophoresekammern Sub-cell GT	BioRad
Inkubator 1000	Heidolph
Kapillarsequenzierer ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Luminescent Image Analyzer LAS-3000	FujiFilm
LightCycler 480 Real-Time PCR-System	Roche
Mikroskop CKX41	Olympus
Microplate reader GENios	Tecan
Mikrozentrifuge 5415C	Eppendorf
Mini-Hybridisierungssofen OV1	Biometra
NanoDrop 1000 (<i>Micro-Volume UV-Vis Spectrophotometer</i>)	Thermo Scientific
Plattformschüttler	Heidolph
Probenmischer Sample Mixer MX1CI	Invitrogen
Spannungsquelle PowerPac Basis	Bio-Rad
Thermo Cycler PTC-200	MJ. Research
Thermomixer TMIX	Analytik Jena
Transferkammer Novex Mini-Cell	Invitrogen
UV Solo TS Imaging System	Biometra
Wasserbad 1004	GFL
Zentrifuge (Rotina 46)	Hettich GmbH

2.2 Zelllinien

Alle GIST-Zelllinien wurden im Brutschrank, bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Sie wachsen adhärent und wurden einmal wöchentlich gesplittet.

GIST-T1	Kit Exon 11 57bp Deletion	Medium HG
GIST48	Kit Exon 11 V560D und Exon 17 D820A	IMDM+
GIST48B	Sublinie von GIST48 ohne KIT Expression	IMDM
GIST430	Kit Exon 11 und Exon 13 V654A	IMDM+
GIST882	Kit Exon 13 K642E	Medium A

Außerdem wurden HEK 293T Zellen verwendet, humane embryonale Nierenzellen, welche das große SV40 T-Antigen exprimieren.

2.3 Zellkulturmedien

Medium A	500ml RPMI 1640
	90ml FBS
	6ml L-Glutamine
	6ml Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin B
Medium HG	500ml DMEM + GlutaMAX
	55ml FBS
	6ml Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin B
Medium IMDM +	500ml IMDM
	90ml FBS
	6ml Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin B
	125 µg Mito
	750 µg BPE

2.4 Gebrauchslösungen

IP-Puffer	10ml 1% Tergitol NP-40 50ml 1M Tris HCL, pH 8 4,199g Na Flouride 13,38g Na Pyrophosphate 0,4839g Na Molybdate 0,3678g Na Vandate 100ml 0,05M EDTA
Lysepuffer (Western Blot)	4ml IP-Puffer 4µl Aprotinin (10mg/ml) 4µl 21mM Leupeptin 40µl 100mM PMSF 40µl 200mM Vanadate
Ladepuffer (Western Blot)	2,812ml 0,5M Tris, pH 6,7 6,75ml 10% SDS 450mg 87% DTT 10ml Glycin 10mg Bromphenolblau mit A.dest. auf 20ml auffüllen
Stripping-Puffer (Western Blot)	6,25ml 100 mM Tris, pH6,7 1ml 20% SDS 0,07ml beta-Mercaptoethanol mit A.dest. auf 10ml auffüllen
Laufpuffer (Western Blot)	21ml MOPS 399ml A.dest.

Transferpuffer (Western Blot)	200ml Methanol 14,4g Glycin 3,03g Tris mit A.dest auf 1l auffüllen
PBS-T (Western Blot)	80g NaCl 2g KCL 14,4g Na ₂ -H ₂ PO ₄ 2,4 KH ₂ PO ₄ 10ml Tween 20 mit A.dest. auf 10l auffüllen
LB-Medium	50g LB-Medium in 2l A.dest. lösen
LB-Amp-Medium	LB-Medium + 100µg/ml Ampicillin
LB-Platten	1,5% Agar-Agar in LB-Medium
LB-Amp-Platten	1,5% Agar-Agar in LB-Medium 100µg/ml Ampicillin
TSS-Puffer	5g PEG 6000 2,5ml DMSO 7,5ml Glycerin 582mg MgCl ₂ in 50ml A.dest. lösen
Puffer AL1 pH 8,0	302mg 50mM Tris 146mg 10mM EDTA 5mg RNase I in 50ml A.dest. lösen

Puffer AL2

399mg 200mM NaOH
2,5ml 20% SDS-Lösung
in 50ml A.dest. lösen

Puffer AL3 pH 5,5

14,72g 3M Kalimacetat
in 50ml A.dest. lösen
8g NaCL
0,38g KCL
0,10g Na₂HPO₄

2xHBS-Puffer pH 7
(Kalziumphosphat-Transfektion)

5g Hepes
1g Glukose
in 500ml A.dest. lösen

2.5 Methoden

2.5.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Die verwendeten Materialien wurden entweder zuvor autoklaviert oder es handelte sich um sterile Einmalartikel.

2.5.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5 % kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die adhärennten Zellen passagiert. Die Passagierung erfolgte alle 7 bis 10 Tage durch „Abtrypsinierung“.

2.5.1.2 Transduktion mit kommerziellen lentiviralen Partikeln (shRNA Knockdown)

Um einen stabilen Knockdown des Zielgens *DOG1* zu erreichen, wurde eine Transduktion mit kommerziell erhältlichen lentiviralen Partikeln (Sigma Aldrich, *MISSION® shRNA Lentiviral Transduction Particles* TRCN0000040263) durchgeführt. Die lentiviralen Partikel enthielten eine *DOG1* spezifische shRNA mit folgender Sequenz: CCGGCGTCGAGTTCAACGACAGAACTCGAGTTTCTGTCTGTTGAACTCGACGTTTTTG. Für die Transduktion erhielten die GIST-Zelllinien (GIST-T1 und GIST882) Medium mit 8µg/ml Polybren und eine der Zellzahl entsprechenden Anzahl von Viruspartikeln (MOI =1, *multiplicity of infection*). Nach einer Inkubation von 24h wurde das Medium erneuert. Nach 48h wurde eine Puromycin-Selektion mit 4 µg/ml durchgeführt um die nicht-transduzierten Zellen abzutöten. Anschließend wurden die Zellen wie gewohnt weiterkultiviert.

Alle Arbeiten wurden in einem S2-Labor durchgeführt.

2.5.2 Zytotoxizitätsbestimmung (Sulforhodamin B-Assay)

Beim Sulforhodamin B-Assay wird der Gesamtproteingehalt der Zellen mit Hilfe des Sulforhodamin B (SRB)-Farbstoffes angefärbt und anschließend photometrisch ausgewertet (Skehan et al. 1990). Es wurde, spezifisch für die jeweilige Zelllinie, eine festgelegte Anzahl von Zellen in 96-Loch Platten ausgesät (GIST-T1 4000 Zellen pro

Loch, GIST882 30.000 Zellen pro Loch). Nach 24h wurden die Zellen mit einer ansteigenden Dosis (3-4fache Bestimmung pro Parameter) der zu untersuchenden Substanz behandelt. Nach einer 72-stündigen Inkubationszeit, wurden die Zellen mit Trichloressigsäure (TCA) für 1h bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit A.dest. gewaschen und für 15 Minuten mit einer 0,4-prozentigen SRB-Lösung (in 1 % Essigsäure) angefärbt. Danach wurden drei Waschschrte mit 1 % Essigsäure durchgeführt, um ungebundenen SRB-Farbstoff aus der Platte zu waschen. Im Anschluss daran wurde 10 mM TRIS-Lösung auf die Platte gegeben und die Absorption des aus den Zellen herausgelösten Farbstoffes bei 560nm im Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Die Messwerte wurden an der Lösungsmittelkontrolle (Wert wird auf „1“ gesetzt) normalisiert. Als Lösungsmittelkontrolle wurde das jeweilige Lösungsmittel (meist DMSO) der untersuchten Substanz verwendet. Aus den Absorptionswerten ließen sich so Rückschlüsse auf die relativen Zellzahlen ziehen.

Mit den normalisierten Daten wurden Liniendiagramme (mit Datenpunkten) in Excel (Microsoft) erstellt, die Nullwerte der X-Achsen entsprachen dabei den Lösungsmittelkontrollen.

2.5.3 Proteinanalyse

2.5.3.1 Proteinisolation

Zur Isolation des Gesamtproteins von Zellen wurden diese zuerst mit kaltem DPBS gewaschen, anschließend wurden die Zellen eine Minute mit Lysepuffer (siehe 2.4 Gebrauchslösungen) inkubiert und danach mit Zellschabern vom Boden abgekratzt. Die Zellsuspension wurde dann auf dem Probenmischer für 1h bei 4°C lysiert. Um den Zellschrott vom Gesamtprotein zu separieren wurde ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 20.000 rcf und 4°C durchgeführt.

2.5.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay nach Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 liegt ungebunden in roter Form vor. Durch Komplexbildung mit Proteinen verschiebt sich

das Absorptionsspektrum und die Lösung wird blau. Die Absorptionswerte der hergestellten Lysate wurden am Mikrotiterplatten-Photometer gemessen und mit einer Proteinstandardkurve verglichen, anschließend wurden alle Lysate auf 2 µg/µl Protein eingestellt, mit 1_3 Ladepuffer (siehe 2.4 Gebrauchslösungen) versetzt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und bei -80°C gelagert.

2.5.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970) wurden die Proteine der Größe nach aufgetrennt. Es wurden 4-12 %ige Gradientengele der Firma Invitrogen verwendet. Um alle Proben miteinander vergleichen zu können, wurden immer 30 µg Protein pro Geltasche eingesetzt, außerdem ein Proteingrößenstandard. Die Gelelektrophoresen wurden gekühlt bei 170 V für 60 Minuten durchgeführt.

2.5.3.4 Western Blot-Transfer

Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe von elektrischer Spannung auf Nitrocellulose übertragen nach der Methode von Towbin et al. (Towbin et al. 1979). Der Transfer fand zwei Stunden bei 25 V statt, dazu wurden die Gele zusammen mit Nitrocellulosemembranen und Transferpuffer (siehe 2.4 Gebrauchslösungen) in Transferkammern überführt. Der erfolgreiche Transfer der Proteine wurde anschließend mit einer Ponceau S-Färbung überprüft.

2.5.3.5 Proteindetektion

Die Detektion der Proteine erfolgte über den Nachweis gebundener Antikörper mittels Chemilumineszenz. Als erstes wurden die freien unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran mit Hilfe einer 5%igen Magermilchpulver-Lösung blockiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Membran mit einem verdünnten Primärantikörper (siehe 2.1.5 Antikörper) über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran fünf Mal mit PBS-T gewaschen und für zwei Stunden mit einem Spezies-spezifischen Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren fünf Waschschritten erfolgte mittels ECL-Lösung und dem *Luminescent Image Analyzer* LAS3000 die Proteindetektion. Die Aufnahmen wurden

anschließend mit den beiden Softwareprogrammen *Photoshop* CS2 (Adobe) und *Illustrator* CS (Adobe) digital weiter bearbeitet.

2.5.3.6 Stripping

Die *Stripping*-Methode erlaubt es mit Hilfe von Wärme und beta-Mercaptoethanol bereits gebundenen Antikörper auf der Nitrozellulosemembran wieder abzulösen und so die Membran mehrmals nutzen zu können. Dazu wurde die Membran bei 50°C mit einem mercaptoethanolhaltigen Puffer (siehe 2.4 Gebrauchslösungen) für 25 Minuten inkubiert, nach mehrmaligem Waschen konnte die Membran dann wieder verwendet werden.

2.5.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analysen)

Bei der Durchflusszytometrie können mit Hilfe von Laserstrahlen die unterschiedlichen optischen Eigenschaften einzelner Zellen analysiert werden. Außerdem können mittels spezifischer Fluoreszenzantikörper bestimmte Zellen bzw. Zellbestandteile markiert und ausgewertet werden.

2.5.4.1 Zellproliferationsuntersuchungen über Bromdesoxyuridin (BrdU)-Inkorporation

Bromdesoxyuridin wird zur Markierung von proliferativen Zellen verwendet. Es handelt sich dabei um ein chemisches Basenanalogon des Nukleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin. Es wird während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Der Einbau kann anschließend mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen BrdU analysiert werden.

Es wurde das *FITC BrdU Flow Kit* von BD Biosciences nach Herstellerangaben verwendet. Die BrdU-Inkubationszeit wurde vor Versuchsbeginn für jede Zelllinie validiert (GIST-T1 2,5h und GIST882 24h).

2.5.4.2 Zellzyklusanalyse

Für die Zellzyklusanalyse wurde der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) verwendet. PI bindet an doppelsträngiger DNA, da sich der DNA-Gehalt der Zelle je

nach Zellzyklusphase unterscheidet (G0/1 = diploid, G2 = tetraploid, S = zwischen di- und tetraploid), kann man dadurch Rückschlüsse auf die Phasenverteilung ziehen (Fried et al. 1976). Zur Zellzyklusanalyse wurden die Zellen für mindestens 1h in 70 % Ethanol fixiert, anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 500 µl DNA-Prep® Stain resuspendiert. Nach einer 20minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen im Zytometer (Fluoreszenzkanal FL2) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ModFit LT® Software.

2.5.5 Molekularbiologische Methoden nach Sambrock *et al.*

2.5.5.1 Isolation genomischer DNA

Die Isolation genomischer DNA aus Zellen oder humanen Tumoren erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte am Mikro-Volumen Spektralphotometer (NanoDrop 1000).

2.5.5.2 RNA-Isolation

Die RNA-Präparation aus Zellsuspensionen und aus Geweben erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Bei Zellsuspensionen wurden nach der Zelllyse zur Homogenisierung die Qiashreder-Säulen verwendet, bei Geweben wurden diese auf Eis im Lysepuffer mit einem Dispergiergerät homogenisiert. Der optionale DNase I-Verdau wurde bei jeder RNA-Isolation durchgeführt, um eventuelle Verunreinigungen mit DNA zu vermeiden.

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte am Mikro-Volumen Spektralphotometer (NanoDrop 1000).

2.5.5.3 Polymerasekettenreaktion nach Mullis *et al.* (Mullis et al. 1992)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird zur Amplifizierung definierter DNA-Fragmente verwendet. Als *Template* wird entweder genomische DNA oder cDNA eingesetzt. Die PCR verläuft in drei Schritten, welche sich 30-40mal zyklisch wiederholen. Im ersten Schritt wird doppelsträngige DNA denaturiert, so dass nur noch Einzelstränge vorliegen. Im zweiten Schritt, dem sogenannten *Annealing*,

lagern sich die Oligonukleotide spezifisch an die einzelsträngige DNA an. Im dritten Schritt katalysiert dann die DNA-Polymerase, die Bildung des fehlenden Stranges, wobei die Oligonukleotidsequenz als Matrize dient. Mit dieser Methode erreicht man so eine exponentielle Vervielfältigung der DNA.

2.5.5.4 cDNA Synthese (Reverse Transkriptase PCR)

Für die cDNA-Synthese wurde das *Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis* Kit von Fermentas verwendet und nach Herstellerprotokoll gearbeitet. Es wurden die im Kit enthaltenen Oligo-dt-Primer verwendet und als *Template* wurde 1 µg RNA (siehe 2.5.5.2 RNA-Isolation) eingesetzt.

2.5.5.5 quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) lassen sich Aussagen über die relativen RNA-Expressionslevel eines spezifischen Gens in einer Probe treffen. Die Quantifizierung erfolgt hierbei über eine Fluoreszenzmessung, die während der laufenden PCR im *LightCycler* stattfindet. Es wurden die kommerziell erhältlichen genspezifische *TaqMan*®-Sonden der Firma Applied Biosystems verwendet, welche mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein (FAM) markiert waren. Es wurde der *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix* von Applied Biosystems nach Herstellerangaben benutzt. Zur Normalisierung der Daten wurde das *House-keeping*-Gen beta-Actin verwendet. Die geräteeigene Software wurde zur Auswertung verwendet.

2.5.5.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung von spezifischen DNA-Abschnitten erfolgte mit sequenzspezifischen Primern und dem *BigDye*® *Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* von Applied Biosystems nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (Sanger *et al.* 1992). Nach der Sequenzierreaktion wurden die Ansätze mittels Ethanolfällung aufgereinigt und in einem ABI PRISM® 310 Kapillarsequenzierer sequenziert. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit der Software SeqMan und EditSeq (DNASTAR) analysiert, außerdem wurden BLAST (*basic local alignment search tool*)-Suchen mit Hilfe der NCBI-Webseite durchgeführt

(<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>).

2.5.5.7 Restriktionsanalyse von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgt durch die Verdauung mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen, welche an enzymespezifischen DNA-Erkennungssequenzen ansetzen. Die Einheit (engl. *unit*) eines Enzyms ist dabei definiert als die Menge Enzym, die 1 µg des λ-Genoms in einer Stunde vollständig schneidet. Daraus ergibt sich folgende Formel zur Ermittlung der einzusetzenden Enzymmenge:

$$\frac{\text{Schnittstellen des Enzyms im Konstrukt}}{\text{Schnittstellen im } \lambda - \text{Genom}} \times \frac{\text{Größe von } \lambda \text{ (49.000bp)}}{\text{Größe des Konstruktes in bp}} = U \text{ pro } \mu\text{g/h}$$

Es wurden die vom Hersteller mitgelieferten 10-fach Puffer verwendet. Die für Klonierungsarbeiten verwendeten Restriktionsprodukte wurden mittels Gelextraktion (siehe 2.5.5.9) aufgereinigt.

2.5.5.8 Dephosphorylierung

Eine Dephosphorylierung ist eine enzymatisch katalysierte Abspaltung einer Phosphatgruppe. Man setzt diese Methode ein, um die Wahrscheinlichkeit einer Religation des Vektors während der Klonierung zu verringern. Dazu wurde 1 µl CIA-Phosphatase nach dem Restriktionsverdau des Vektorplasmids zum Restriktionsansatzes zugegeben und nochmals 30 Minuten bei 37°C inkubiert, zum Abstoppen der Enzymreaktion wurde anschließend der Ansatz 15 Minuten auf 85°C erhitzt.

2.5.5.8 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach einer Restriktion wurden Gelelektrophoresen durchgeführt. Die DNA-Proben wurden mit 6-fach Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Größenstandard auf ein 1%iges ethidiumbromidhaltiges Agarose-Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 100 V für 30 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Die Analysen der Gele erfolgte über eine UV-Anregung im UV Solo TS Imaging System.

2.5.5.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurden zuerst die entsprechenden Banden unter UV-Licht-Bestrahlung herausgeschnitten. Die anschließende Aufreinigung wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen durchgeführt.

2.5.5.10 Topo-Subklonierung

Für die Topo-Subklonierung wurde das *pcDNA3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit* von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. Der im Kit enthaltene Vektor liegt bereits linearisiert vor. Er hat an den 3'-Enden Desoxythymidin-Überhänge und hat kovalent Topoisomerase I gebunden, wodurch die direkte Insertion eines Inserts mit Desoxyadenosin-Überhängen an den 3'-Enden möglich ist (Shuman 1994). Für die Ligation wurden 4 µl des jeweiligen Inserts verwendet und es wurden 2 µl des Ligationsansatzes für die Transformation in Top10 *E.coli* Bakterien eingesetzt.

2.5.5.11 Ligation von DNA-Fragmenten (Plasmidklonierung)

Unter Ligation versteht man die enzymvermittelte Verschmelzung zweier DNA-Fragmente. Durch Restriktion von DNA-Fragmenten entstehen an deren Enden Überhänge, die sogenannten *sticky ends*. Diese Schnittenden können sich leicht mit Hilfe von Ligase wieder mit entsprechend komplementären Enden paaren.

Zur Konstruktion rekombinanter Plasmide wurden Ligationen über Nacht bei 16°C mit 100 ng linearisierten dephosphorylierten Expressionsvektor, DNA-Insert und 1U T4-DNA-Ligase durchgeführt. Dabei betrug das molare Verhältnis zwischen Insert und Vektor 1:3.

Als Positivkontrolle wurde der ungeschnittene Expressionsvektor verwendet und als Negativkontrolle der geschnittene Expressionsvektor verwendet.

2.5.5.12 Herstellung Hitzeschock kompetenter Bakterien

Als Kompetenz bezeichnet man die Fähigkeit von Bakterien fremde DNA aufzunehmen. Diese Fähigkeit nutzt man zur Plasmidvermehrung.

Es wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des *Escherichia coli* –Stamms DH5α angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde dann

verwendet, um in 400 ml LB-Medium Bakterien bis zu einer OD600 (optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm) von 0,9 anzuziehen. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis, wurden die Bakterien für 15 Minuten bei 3000 rcf zentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde in 50 ml TSS-Puffer resuspendiert und nochmals für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien aliquotiert und bei -80°C weggefroren.

2.5.5.13 Hitzeschock-Transformation der Bakterien

Als Transformation bezeichnet man die Übertragung freier DNA in kompetente Bakterien. Zu 200 µl kompetenter Bakterien wurden 10 µl des Ligationsansatzes gegeben. Danach erfolgte eine halbstündige Inkubation auf Eis. Es folgte ein zweiminütiger Hitzeschock bei 42°C, anschließend eine Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium und einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C, wurden die Ansätze für eine Minute bei 1500 rcf zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Restvolumen resuspendiert und auf einer LB-Amp-Platte ausplattiert. Die Kulturplatten wurden über Nacht bei 37°C gelagert.

2.5.5.14 DNA-Aufreinigung im kleinen und mittleren Maßstab

Zur DNA-Aufreinigung wurde die Technik der alkalischen Lyse verwendet. Hierbei wird der pH-Wert ins alkalische verschoben, wodurch sich die Wasserstoffbrückenbindungen lösen und nur die Plasmid-DNA zur Renaturierung in der Lage ist.

Für die DNA-Präparation im kleinen Maßstab wurden selbsthergestellte Puffer verwendet. Es wurden 2 ml LB-Amp-Medium mit einer, über Nacht auf der LB-Amp-Platte gewachsenen, Einzelkolonie angeimpft und erneut über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 1,5 ml der Kultur fünf Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 300 µl Puffer AL1 resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer AL2 erfolgte eine Inkubation von fünf Minuten, danach wurden 300 µl Puffer AL3 hinzu gegeben. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 rcf für 20 Minuten. Der Überstand wurde mit 600 µl Isopropanol versetzt und bei 14.000 rcf für 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 30-50 µl A.dest. aufgenommen.

Die Präparation im mittleren Maßstab erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *JETstar Plasmid Purification MIDI Kit*. Die DNA-Konzentration wurde am Mikrovolumen Spektralphotometer (NanoDrop 1000) gemessen.

2.5.5.15 Herstellung von lentiviralen Partikeln

2.5.5.15.1 Kalziumphosphat-Transfektion / Produktion und Transduktion lentiviraler Partikel

Bei der Methode der Kalziumphosphat-Präzipitation wird ein Nukleinsäure-Phosphat-Komplex gebildet, welcher vermutlich mittels Endozytose von den Zellen aufgenommen wird. So findet eine transiente Expression der eingebrachten Fremd-DNA in den Zellen statt (Graham and van der Eb 1973). Als Produktionszellen wurden HEK 293T-Zellen verwendet. Einen Tag vor der Transfektion wurden 1×10^6 HEK 293T-Zellen in Kulturschalen (Durchmesser 10 cm) ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden je 3 µg der beiden Verpackungsvektoren psPAX (kodierend für die viralen Proteine gag und pol) und pMD2 (kodierend für das virale Protein env) und des Expressionsvektors pLenti in 440 µl A.dest verdünnt und anschließend mit 60 µl einer 2M Kalziumchlorid-Lösung versetzt. Der Vektor-CaCl₂-Mix wurde unter Vortexen in 500µl des 2xHBS-Puffers getropft und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Medium der 293T-Zellen gegen frisches Nährmedium mit 25 µM/ml Chloroquin ausgetauscht und der Transfektionsansatz langsam in die Kulturschalen getropft. Nach einer Inkubationszeit von 5h bei 37°C wurde das Medium erneut ausgetauscht.

24h und 48h nach der Transfektion wurde das Medium mit den viralen Überständen steriltfiltriert geerntet und entweder sofort verwendet oder bei -80°C eingefroren.

Zur Transduktion der Zielzellen mit viralen Partikeln, wurden die Zellen dünn ausgesät und 24h bei 37°C mit den Überständen inkubiert. Nach 48h konnte die Transduktionseffizienz mikroskopisch anhand der GFP-Expression überprüft werden und anschließend konnte eine Puromycin-Selektion mit 4 µg/ml erfolgen, um nicht-transduzierte Zellen zu eliminieren.

2.5.6 *In vivo* / Tierversuche

Die nachfolgend beschriebenen Tierversuche wurden entsprechend des § 8 des Tierschutzgesetzes vom 25. Mai 1998 im Universitätsklinikum Essen beantragt und genehmigt (Aktenzeichen: 8.87-50.10.37.09.274 und 87-51.04.2010.A323).

Die weiblichen Mäuse, athymische Nacktmäuse und NOD/SCID Mäuse, stammten aus der Zucht des Zentralen Tierlabors des Universitätsklinikums Essen. Beide Mausstämme sind aufgrund ihrer Immundefizienz etablierte Modelle für heterotransplantierte humane Tumore (Morton and Houghton 2007).

Die Tiere wurden in einer Tierversuchsanlage des Universitätsklinikums Essen unter standardisierten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur 20°C, relative Luftfeuchtigkeit 55 % \pm 5 %, Tag-Nacht-Rhythmus 12 Stunden durch Kunstlicht bei 300 Lux). Pelletiertes Futter und entkeimtes Trinkwasser stand den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung.

2.5.6.1 Heterotransplantation von Tumorzellen (Zelllinien/Patientenmaterial)

Die Heterotransplantationen erfolgten durch subkutane Injektion von Zellkulturzellen (10×10^6 Zellen pro Flanke) oder Zellen, die aus Tumorbiopsien gewonnen wurden, im Bereich der Flanken. Für die Gewebedisaggregation des Patiententumormaterials wurden die Tumorstückchen erst mechanisch zerkleinert und anschließend mit einer Kombination proteolytischer Enzyme (Collagenase/Dispase) über Nacht bei 37°C verdaut. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension den Mäusen injiziert, wobei ein Applikationsvolumen von 300 μ l und eine maximale Zellzahl von 10×10^6 Zellen nicht überschritten wurden. GIST-48 Zellen wurden mit BD Matrigel™ (Basement Membrane Matrix, BD Biosciences) injiziert.

Um eine Stabilität der Modelle gewährleisten zu können, wurden die in den Tieren gewachsenen Tumoren entfernt, zerkleinert und erneut in nicht tumortragende Mäuse passagiert.

2.5.6.2 perorale Applikation und Tumorvermessung

Die perorale Applikation von 100 mg/kg Imatinib erfolgte mit Hilfe einer Schlundsonde über 14 Tage. Das Vermessen der lokalen Tumoren im Bereich der Injektionsstellen erfolgte in zweitägigen Abständen mit einer Schieblehre, wobei alle

Tumoren jeweils in 2 Dimensionen vermessen wurden. Zur Berechnung des Tumolvolumens wurde folgende Formel verwendet: $\frac{\text{Länge} \times \text{Breite}^2}{2}$

2.5.6.3 Tötung und Sektion der Versuchstiere

Nach Versuchsende oder nach Erreichen einer kritischen Tumorgroße von 15 mm x 15 mm Durchmesser wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Als Richtlinie zum vorzeitigen Töten der Versuchstiere wurden die Empfehlungen der GV-SOLAS befolgt.

Bei der Sektion erfolgte zunächst die Inzision der Haut vom Schambein bis zum Unterkiefer mit einem Skalpell, anschließend erfolgte das stumpfe Abpräparieren der Haut von Bauch- und Thoraxwand. Die subkutanen Tumoren wurden entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren bzw. in Formalin fixiert. Danach wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Organe auf pathologische Veränderungen hin untersucht.

2.5.6.4 Immunhistochemische Färbungen

Die Paraffinierung der Mäusetumoren und die immunhistochemischen Färbungen wurden im Institut für Pathologie und Neuropathologie am Universitätsklinikum Essen von Dr. F. Grabellus und Dr. B. Schwindenhammer angefertigt.

Es wurden 4 µm dicke Schnitte am Microtom von den paraffinierten Mäusetumoren angefertigt, anschließend wurden diese entparaffiniert. Eine Hitze-induzierte Antigendemaskierung wurde mit dem *Target Retrieval Solution Citrate* Puffer (pH 6) von Dako durchgeführt. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die unter 2.1.6 aufgeführten Primärantikörper verwendet, als Detektionssystem wurde das *ZytoChem-Plus HRP Polymer Kit* von Zytomed Systems verwendet. Die Zellkerne wurden mit einer Hämatoxylin-Färbung blau angefärbt und die kationischen und eosinophilen Strukturen, wie z.B. Proteine im Zytoplasma, mit Eosin hellrosa angefärbt.

2.5.6.5 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Xenografttumoren

Um die Xenografttumoren analysieren zu können, mussten diese erst mechanisch zerkleinert und anschließend mit einer Kombination von proteolytischen Enzymen

(Collagenase/Dispase) über Nacht bei 37°C verdaut werden. Am nächsten Tag wurde die Tumorzellsuspension auf einen Objektträger aufgetropft und getrocknet. Die anschließende manuelle Auswertung der Tumorzellsuspensionen erfolgte mit dem digitalen Keyence BZ9000 Fluoreszenzmikroskop (Model BIOREVO) mit integrierter Kamera und BZ-Analyser Software.

2.5.7 Expressions-Arrays und SNP-Arrays

Durchführung und Auswertung der Mikroarrayanalysen und der Einzelnukleotidpolymorphismen-Analysen, sogenannte SNP-Array-Analysen, erfolgten am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg-Essen durch Herrn PD Dr. Klein-Hitpass.

Für die Expressions-Arrays wurde der *Microarray HG-U133Plus_2.0* von Affymetrix verwendet und für die SNP-Array-Analysen der *GeneChip Human Mapping 250K Nspl Array* von Affymetrix. Alle Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Affymetrix Gene Expression Analysis Technical Manual Version 2). Für die Expressions-Arrays wurden 5 µg RNA eingesetzt, die aus murinen Tumoren oder humanen Zellkulturen, wie in Abschnitt 2.5.5.2 RNA-Isolation beschrieben, gewonnen wurden. Für die SNP-Arrays wurden 250 ng DNA (2.5.5.1 Isolierung genomischer DNA) aus humanen oder murinen Tumoren eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der *Affymetrix Microarray Suite* (Version 5.0) Software und der CNAG (*Copy Number Analyzer for GeneChip*)-Software (GenomeLaboratory).

2.5.8 Whole-Cell-Patch-Clamp-Technik

Die *Patch-Clamp*-Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. L. Galletta von Dr. L. Ferrera am Istituto Giannina Gaslini in Genova (Italien) durchgeführt.

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik, in der sogenannten Whole-Cell (Ganz-Zell) – Konfiguration, konnte der Chloridflux von GIST-T1 und GIST882 Zellen, jeweils mit und ohne DOG1-Knockdown, gemessen und miteinander verglichen werden. Die freie Calcium-Konzentration in der intrazellulären Pipetten-Lösung betrug 305 nmol/L. Die Daten wurden mit der Igor Software (Wavemetrics, Portland, USA) analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung von GIST-Xenograftmodellen

Es wurden unterschiedliche Strategien für die Modelletablierung verfolgt. Um neue GIST-Linien zu generieren, wurden zum einen systematisch Patientenproben in athymische Nacktmäuse transplantiert und zum anderen wurden bereits etablierte Zelllinien auf ihre Tumorigenität hin untersucht und systematisch selektioniert.

3.1.1 Etablierung von GIST-Xenograftmodellen aus Patientenmaterial

3.1.1.1 Etablierung und Charakterisierung neuer GIST-Xenograft-Modelle und neuer GIST-Zelllinien aus Patiententumorgewebe

Es wurden 20 Tumorgewebeproben von 17 unterschiedlichen GIST-Patienten unmittelbar nach operativer Entnahme enzymatisch verdaut und anschließend subkutan in die Flanken von immundefizienten Nacktmäusen transplantiert. Von den transplantierten humanen Tumorzellsuspensionen zeigten 10 Tumorproben eine Tumorigenität in Mäusen, von denen sieben Tumore erfolgreich weiter passagiert werden konnten (Tab. 1).

Tabelle 1: Auflistung aller subkutan transplantierten Patientenproben mit anonymisierter Patienten-ID, KIT-Mutationsstatus, Tumorigenität und Passagierbarkeit.

	Patient	Mutation	Tumorbildung	Passage
1	AZ38 OPI	Exon 11 V560D / Ex17 C809V frameshift stopcodon 813	Ja	P12
2	AZ38 OPII	Exon 11 V560D / Ex17 C809V frameshift stopcodon 813	Ja	P10
3	HJD43	n.n.	Ja	P6
4	GS44	Exon 11 V559D	Ja	P0
5	MD66	Exon 9 S476I	-	-
6	PK55	Ex11 del	-	-
7	DR72 OPI	Ex9 dupl Codon 502 und 503, Ex17 Y823	-	-
8	DR72 OPII	Ex9 dupl Codon 502 und 503, Ex17 Y823	-	-
9	MP75	Exon 11 del E554 V559/ Ex17 N822K	Ja	P0
10	KM62	Exon 11 Trp557-Lys558del	-	-
11	MT63	Exon 11 Tyr553-Lys558del	Ja	P1
12	WC35	Exon 11 6bp del	Ja	P1
13	CJ56	n.n.	-	-
14	AS47	Exon 11 W557-V559 del	-	-
15	UO50	Exon 13 K642E	-	-
16	TH60	n.n.	Ja	P0
17	KL68	Ex11 L567P	-	-
18	NS72 OPI	Wildtyp	Ja	P1
19	ÖÜ42	n.n.	-	-
20	NS72 OPII	Wildtyp	Ja	P2

Diese Tumoren weisen sowohl histomorphologisch als auch immunhistochemisch (KIT, DOG1 positiv) eine sehr hohe Ähnlichkeit mit den Primärtumoren auf (Abb. 5). So konnte die bislang weltweit erste GIST-Linie eines Neurofibromatose-Typ-I assoziierten GIST etabliert werden (NS72).

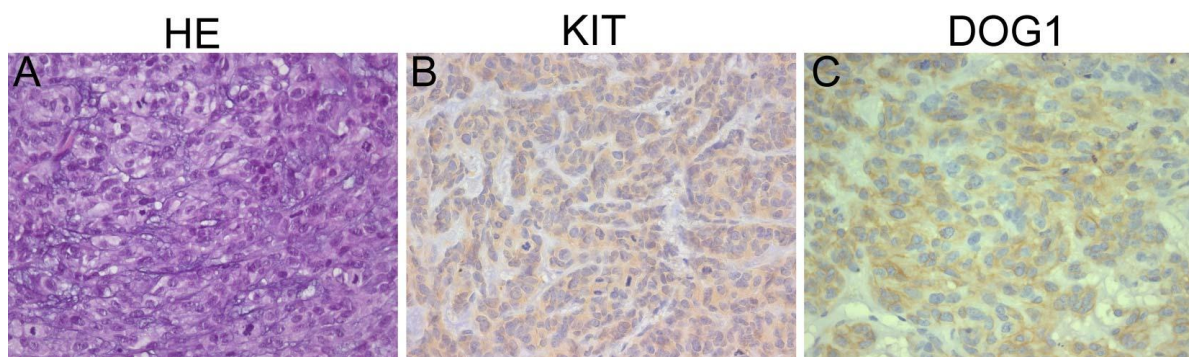


Abbildung 5: Immunhistochemische Analyse eines GIST-Xenografttumors vom Patienten NS72. Der Tumor zeigt eine typische spindelförmige Morphologie, enthält viele Mitosen (A) und ist sowohl KIT-positiv (B) als auch DOG1-positiv (C).

Die höchste Tumorigenität und *in vivo* Passagierbarkeit konnte bei der Gewebeprobe AZ38 beobachtet werden. Die Latenzzeit von der Injektion der Zellsuspension bis zur Palpierbarkeit des Tumors betrug im Durchschnitt 26,4 Tage, die durchschnittliche Verdopplungsrate lag bei 8,1 Tagen (Tab. 2).

Tabelle 2: Auflistung aller Wachstumscharakteristika der AZ38-Xenografttumoren.

AZ38				
Passage	Latenzzeit (Tage)	Wachstumszeit (Tage)	Verdopplungszeit (Tage)	Finale Tumorratio (mm ²)
0	36	110	13,9	1370
1	42	100	9,5	1166
2	13	47	5,9	1786
3	13	61	7,1	943
4	55	92	5,2	2192
5	10	51	7,2	412
6	11	52	7,3	975
7	19	63	7,2	746
8	38	93	9	1037
9	27	90	10,5	938
10	36	82	6,2	1452
11	17	43	8,9	604

Mutationsanalysen der AZ38-Xenografttumoren zeigten, dass die primäre Exon 11 Punktmutation V560D des Patienten auch in den Xenografttumoren nachweisbar war (Abb. 6A und C). Außerdem konnte eine sekundäre Punktmutation in Exon 17 (D820G) sowohl im Patienten als auch im Xenograft gefunden werden (Abb. 6B und D).

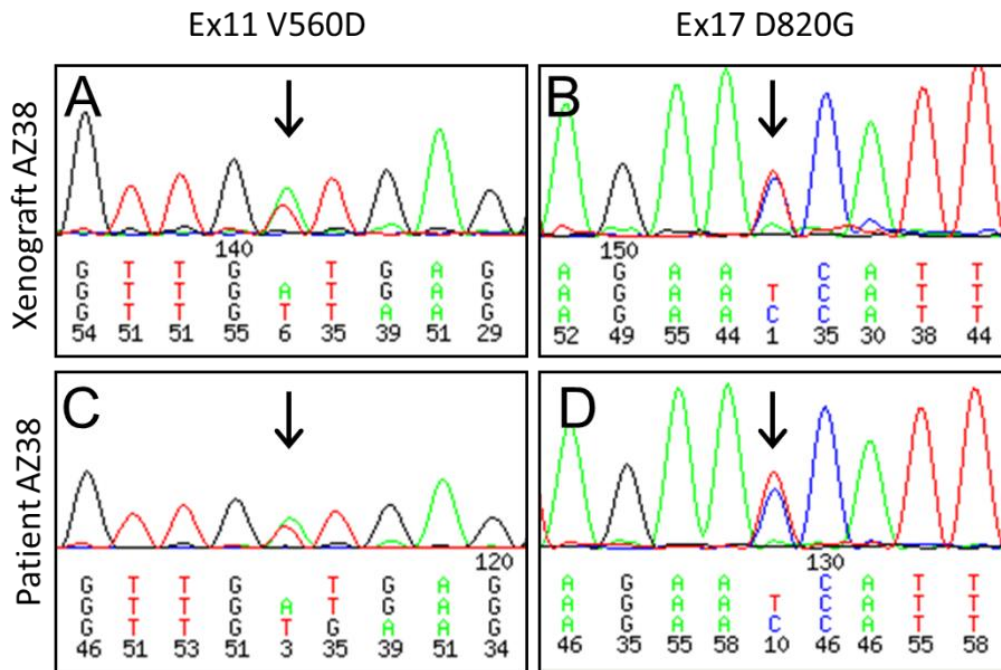


Abbildung 6: Auszug aus dem Chromatogramm der Sequenzanalyse des AZ38-Xenografttumors. Jeder der vier farbigen Peaks steht für ein Nukleotid der DNA: A (Adenin), C (Cytosin), G (Guanin), T (Thymin). (A) Durch einen heterozygoten Nukleotidaustausch von Adenin nach Thymin in der DNA wird auf Aminosäureebene Valin (V) durch Asparaginsäure (D) ersetzt und (B) durch einen heterozygoten Nukleotidaustausch von Cytosin nach Thymin in der DNA wird auf Aminosäureebene Asparaginsäure (D) durch Glycin (G) ersetzt.

Um die genetische Homologie des murinen Tumormodells mit dem humanen Ausgangstumor zu vergleichen, wurden SNP-Array-Analysen durchgeführt. Die Analyse ergab, dass die beiden Proben zu 91,4 % homolog sind.

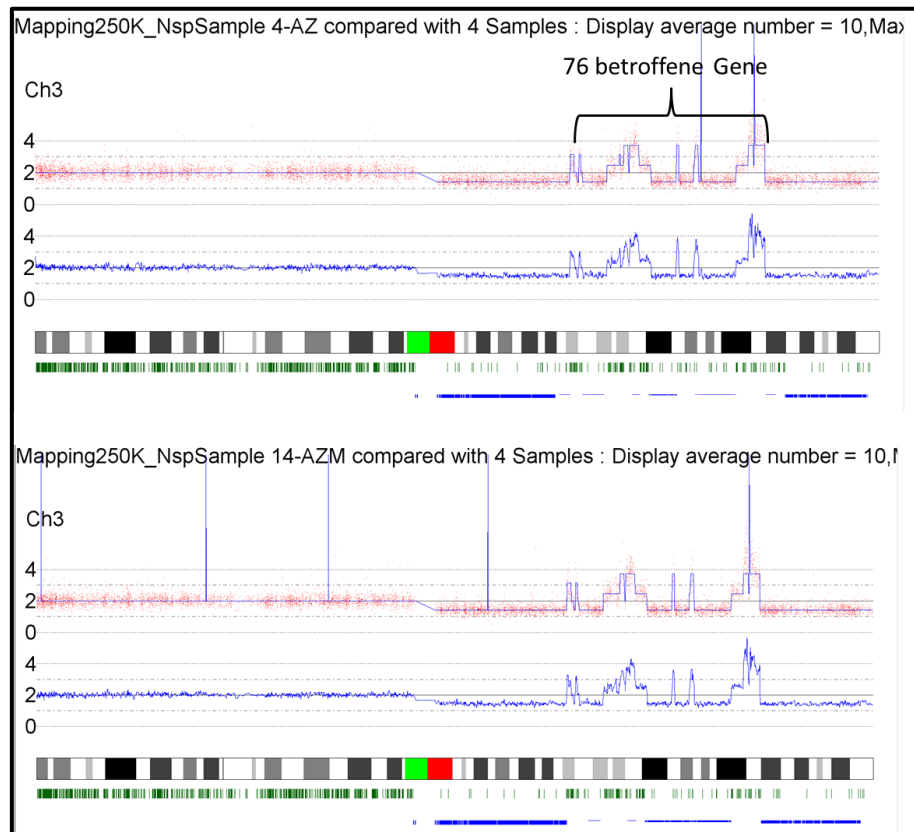


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung von Chromosom 3 der SNP-Array Analyse.

Es konnte erfolgreich eine Zelllinie aus den AZ38-Xenografttumoren etabliert werden. AZ38-GIST-Zellen zeigen eine starke Expression von KIT und pKIT, die aktivierte phosphorylierte Form von KIT, im Western Blot. Auch die KIT-abhängigen Signalwege sind in den AZ38-Zellen aktiviert (Abb. 8A). Zum Zeitpunkt der Operation hatte der Patient bereits Therapien mit Imatinib, Sunitinib und Sorafenib erhalten. Die etablierten Zellen zeigten im Zytotoxizitätstest ebenfalls eine Imatinib-Resistenz. Der IC_{50} -Wert konnte nicht ermittelt werden, die maximale Substanzkonzentration lag in diesem Experiment bei 10 μ M. Allerdings konnte mit dem Multi-Kinase-Inhibitor Regorafenib eine spezifische Inhibierung von KIT und KIT-abhängigen Signalwegen bei einer Konzentration von 1 μ M erreicht werden (Abb. 8B).

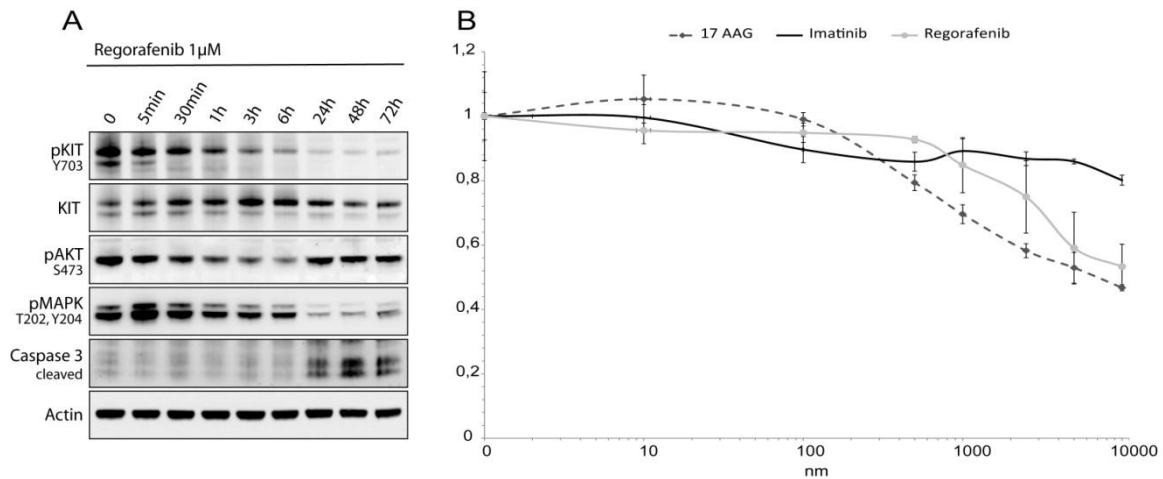


Abbildung 8: Inhibition von KIT und KIT-abhängiger Signalwege durch Regorafenib in AZ38-Zellen (A). Zytotoxizitäts-Assay nach 3 Tagen Inkubation mit ansteigenden Dosierungen von Regorafenib (B).

3.2.1 Etablierung von GIST-Xenograftmodellen aus GIST-Zelllinien

3.2.1.1 GIST-Zelllinien sind tumorigen in immundefizienten Mäusen

Insgesamt wurde die Tumorigenität von 13 humanen GIST-Zelllinien (Tab. 3) in NOD/SCID- und Nacktmäusen untersucht.

In NOD/SCID-Mäusen fand sich ein Engraftment von GIST-T1 von 100 % und bei GIST882 Zellen von 50 %. GIST48, GIST430 und GIST48B Zellen waren nicht xenogen.

Im Nacktmaus-Stamm lag die Anwachsrate bei 100 % für alle Zelllinien. Bei GIST48 Zellen gelang dies nur in Verbindung mit Matrigel, eine Lösung mit Extrazellulärmatrix-Proteinen (gewonnen aus murinen Engelbreth-Holm-Swarm Sarkomen).

Aufgrund der hohen Anwachsrate und der deutlich besseren Palpierbarkeit der Tumoren wurde in allen weiteren Versuchen nur noch der Nacktmaus-Stamm verwendet.

Tabelle 3: Auflistung aller subkutan transplantierten GIST-Zelllinien.

GIST-Zelllinien					
Zelllinie	Mutation	angewachsen		KIT- positiv	IM-Behandlung
		NOD/SCID	nude		
1 GIST-T1	Exon 11 57bp del V560D-Y578	ja	ja	ja	ja
2 GIST 882	Exon 13 K642E	Ja (50%)	ja	ja	ja
3 GIST 430-11	Exon 11 51bp del V560D-L567	-	ja	ja	-
4 GIST 430	Exon 11 51bp del + Ex13 V654A	nein	ja	ja	-
5 GIST 48P	Exon 11 V560D + Exon 17 D820A	nein	ja*	ja	-
6 GIST 48B	Exon 11 V560D + Exon 17 D820A KIT-negativ	nein	-	-	-
7 GIST-T1 shDOG1	Exon 11 57bp del V560D-Y578 DOG1-negativ	-	ja	ja	ja
8 GIST-T1 T670I	Exon 11 57bp del V560D-Y578 + T670I	-	ja	ja	ja
9 GIST-T1 D816E	Exon 11 57bp del V560D-Y578 + D816E	-	ja	ja	ja
10 GIST-T1 D820A	Exon 11 57bp del V560D-Y578 + D820A	-	ja	ja	ja
11 GIST-T1 A829P	Exon 11 57bp del V560D-Y578 + A829P	-	ja	ja	ja
12 GIST-T1 luc	Exon 11 57bp del V560D-Y578 +Luciferase	-	ja	ja	-
13 GIST-T1 IGFBP5	Exon 11 57bp del V560D-Y578 +IGFBP5	-	ja	ja	-

3.2.1.2 GIST-Xenograftmodelle behalten ihre Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber Imatinib

Anschließend wurde untersucht, ob die *in vitro* beobachtete Imatinib-Sensitivität auch *in vivo* erhalten bleibt. In Absprache mit Frau Prof. Dr. Debiec-Rychter (K.U. Leuven, Belgien) wurde den Mäusen eine tägliche Imatinib-Dosis von 200 mg/kg über eine Schlucksonde verabreicht. Eine effektive Wachstumshemmung durch Imatinib in Imatinib-sensiblen GIST-T1-Xenografttumoren wurde sowohl durch eine zweimal tägliche Behandlung mit 100 mg/kg Imatinib, als auch durch eine einmal tägliche Dosis von 200 mg/kg Imatinib erreicht. Es konnte nach 14 Tagen Behandlung in beiden Imatinib-Gruppen eine vergleichbare Wachstumshemmung erzielt werden. Die finale, normalisierte Tumorratio der Kontrollgruppe betrug 2,0, die finale,

normalisierte Tumorratio der Einmaldosis-Gruppe 0,32 und die der Zweimaldosis-Gruppe 0,36 (Abb. 9). Aufgrund der geringeren Belastung der Tiere wurde in den weiteren Versuchen nur noch eine Dosis pro Tag verabreicht.

Eine Wachstumshemmung durch Imatinib wurde auch in Imatinib-sensiblen GIST882-Xenografttumoren erzielt. Hier lag die final normalisierte Tumorratio in der Kontrollgruppe nach Versuchsende bei 2,1 und in der Imatinib-Gruppe bei 0,8 (Abb. 9).

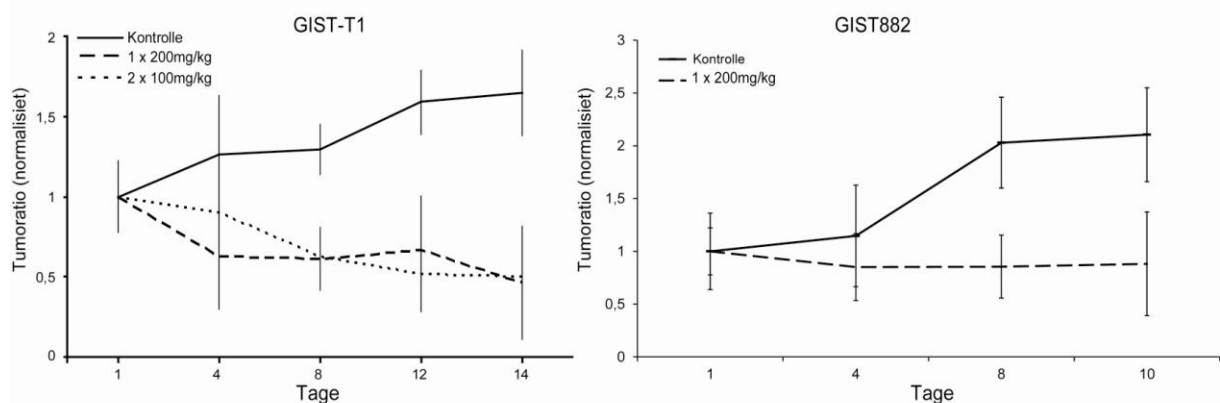


Abbildung 9: *In vivo* Xenograft-Wachstumskurven von GIST-T1 und GIST882 Zellen mit und ohne Imatinib-Behandlung.

Bei den Imatinib-resistenten isogenen GIST-T1 Sublinien konnte wie erwartet keine Wachstumsinhibition durch Imatinib beobachtet werden. Sowohl die Verdopplungszeiten und auch die finalen Tumorratios der mit Imatinib-behandelten Xenografttumoren unterschieden sich deutlich von denen der unbehandelten Tumoren (Abb. 8). Die finale Tumorratio der unbehandelten GIST-T1^{D820A}-Tumoren lag nach vier Wochen bei 860 mm² mit einer Verdopplungszeit von 5,1 Tagen und die finale Tumorratio der Imatinib-behandelten GIST-T1^{D820A}-Tumoren lag nach vier Wochen bei 1576 mm² mit einer Verdopplungszeit von 4 Tagen (Abb. 10A).

Die finale Tumorratio der unbehandelten GIST-T1^{A829P}-Tumoren lag nach vier Wochen bei 348 mm² mit einer Verdopplungszeit von 4,3 Tagen und die finale Tumorratio der Imatinib-behandelten GIST-T1^{A829P}-Tumoren lag nach 4 Wochen bei 985 mm² mit einer Verdopplungszeit von 4,7 Tagen (Abb. 10B).

Die finale Tumorratio der unbehandelten GIST-T1^{D816E}-Tumoren lag nach 8 Wochen bei 530mm² mit einer Verdopplungszeit von 9,5 Tagen und die finale Tumorratio der Imatinib-behandelten GIST-T1^{D816E}-Tumoren lag bei 1286 mm² mit einer

Verdopplungszeit von 8,3 Tagen (Abb. 10C).

Die finale Tumorratio der unbehandelten GIST-T1^{T670I}-Tumoren lag nach 11 Wochen bei 403mm² mit einer Verdopplungszeit von 12,7 Tagen und die finale Tumorratio der Imatinib-behandelten GIST-T1^{T670I}-Tumoren lag bei 1921 mm² mit einer Verdopplungszeit von 11,6 Tagen (Abb. 10D).

Imatinib wurde bei diesen Versuchen über das Trinkwasser verabreicht, um den Tieren die Belastung einer täglichen Sondierung über einen längeren Zeitraum (> 14 Tage) zu ersparen.

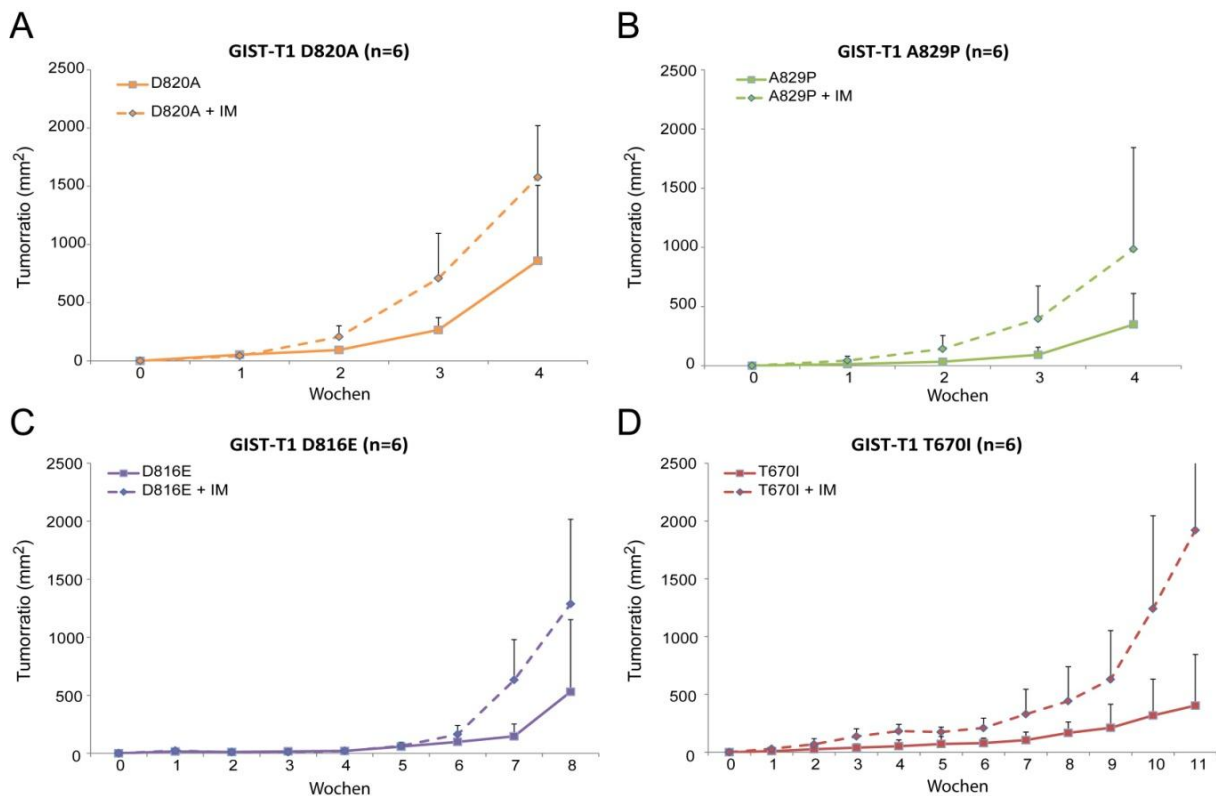


Abbildung 10: *In vivo* Xenograft-Wachstumskurven der vier verschiedenen GIST-T1 Sublinien mit und ohne kontinuierliche Imatinib-Behandlung über das Trinkwasser.

3.2.1.3 GIST-Xenografttumoren behalten die charakteristische Zellmorphologie und Proteinexpression eines GIST

In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung der GIST-T1 Xenografttumoren konnte man Zellen mit einer spindelzelligen Morphologie erkennen, welche für 70 % der humanen GIST charakteristisch ist (Abb. 11A und D). Außerdem konnte eine starke KIT-Expression nachgewiesen werden (Abb. 11B), welche nach einer 14-tägigen

Behandlung mit Imatinib abnahm (Abb. 11E). Die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 war nach der Behandlung mit Imatinib kaum noch nachweisbar und bestätigte so die wachstumshemmende Wirkung von Imatinib in den GIST-T1-Xenografttumoren (Abb. 11E und F).

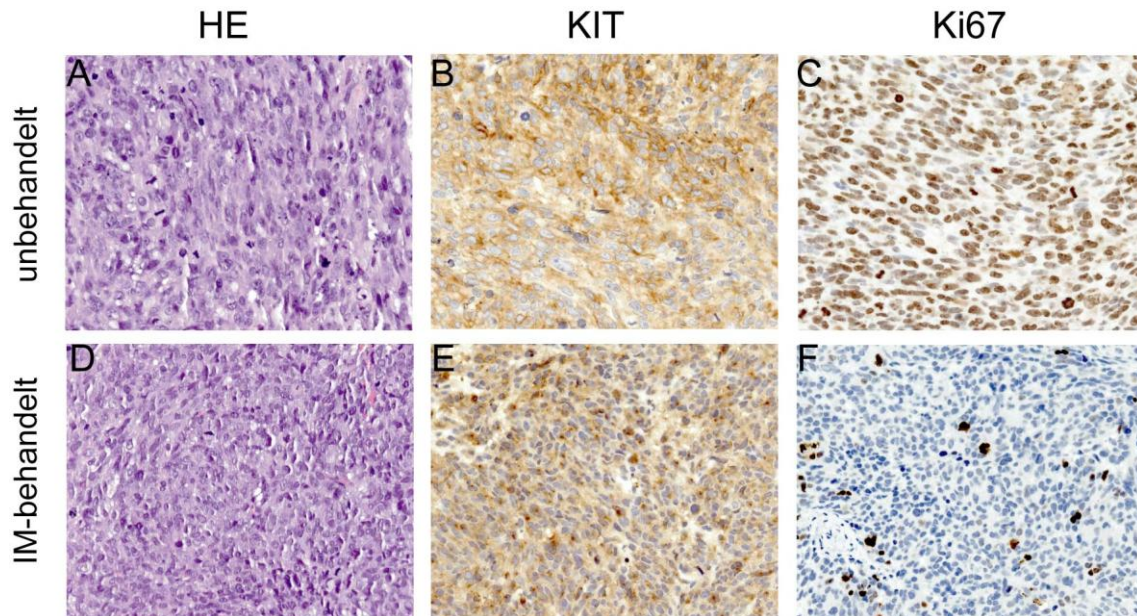


Abbildung 11: Immunhistochemische Analyse von GIST-T1 Xenografttumoren mit und ohne Imatinib-Behandlung. Gewebeschnitte von Paraffin-fixierten Tumoren wurden mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (A, D) morphologisch untersucht. Der spezifische Nachweis von KIT erfolgte durch eine immunhistochemische Färbung mit einem anti-human KIT-Antikörper (B, E). Die Ki67-Färbung diente als Proliferationsnachweis (C, F).

3.3 Etablierung neuer isogener Sublinien der GIST-T1 Zelllinie (*in vitro*)

Durch dauerhafte Selektion mit Imatinib konnten zwei neue Sublinien der parentalen GIST-T1 Linie etabliert werden. Dazu wurden mehrere Ansätze mit GIST-T1 Zellen 12 Monate lang mit ansteigenden Imatinib-Konzentrationen (10 nM bis 5 µM) behandelt.

Die Sequenzierung von KIT zeigte die bekannte Exon 11 Deletion der parentalen GIST-T1 und jeweils eine neue sekundäre Exon 17 Punktmutation. Bei GIST-T1^{D816E}, wurde durch einen heterozygoten Nukleotidaustausch von Cytosin nach Adenin in der DNA und auf Aminosäureebene Asparaginsäure (D) durch Glutaminsäure (E) ersetzt (Abb. 12A). In der zweiten Sublinie, GIST-T1^{D820A}, erfolgte ein heterozygoter Nukleotidaustausch von Adenin nach Cytosin in der DNA und auf Aminosäureebene ein Austausch von Asparaginsäure (D) mit Alanin (A) (Abb.12B).

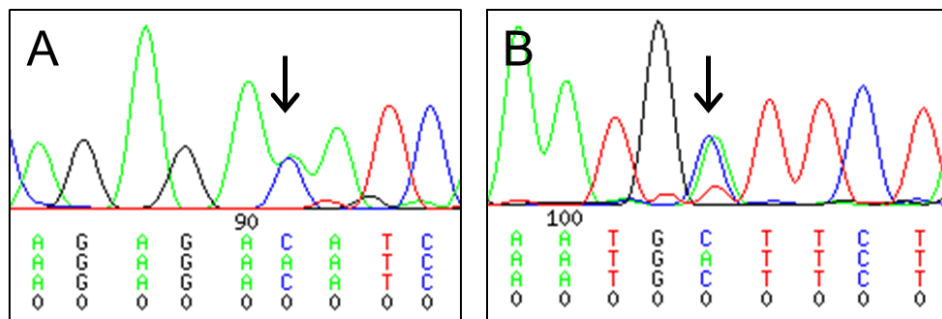


Abbildung 12: Auszug aus dem Chromatogramm der Sequenzanalyse der neuen Sublinien von GIST-T1. Jeder der vier farbigen Peaks steht für ein Nukleotid der DNA: A (Adenin), C (Cytosin), G (Guanin), T (Thymin).

Parentale GIST-T1 Zellen weisen eine starke KIT-Abhängigkeit auf. Die IC₅₀-Werte für Imatinib, Sunitinib und Regorafenib liegen bei 4,5 nM, 5 nM, und 35 nM.

Die IC₅₀-Werte der beiden neuen Sublinien, GIST-T1^{D816E} und GIST-T1^{D820A}, lagen bei 1500 nM für Imatinib. Für Regorafenib lag die IC₅₀ bei 550 nM für GIST-T1^{D816E} bzw. bei 600 nM für GIST-T1^{D820A}. Für Sunitinib konnten keine IC₅₀-Werte ermittelt werden, da bis zu einer Konzentration von 10 µM keine Toxizität gemessen wurde. Im Western Blot konnte eine deutliche KIT- und DOG1-Expression sowie eine Aktivierung der KIT-abhängigen Signalwege in allen GIST-T1 Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 13).

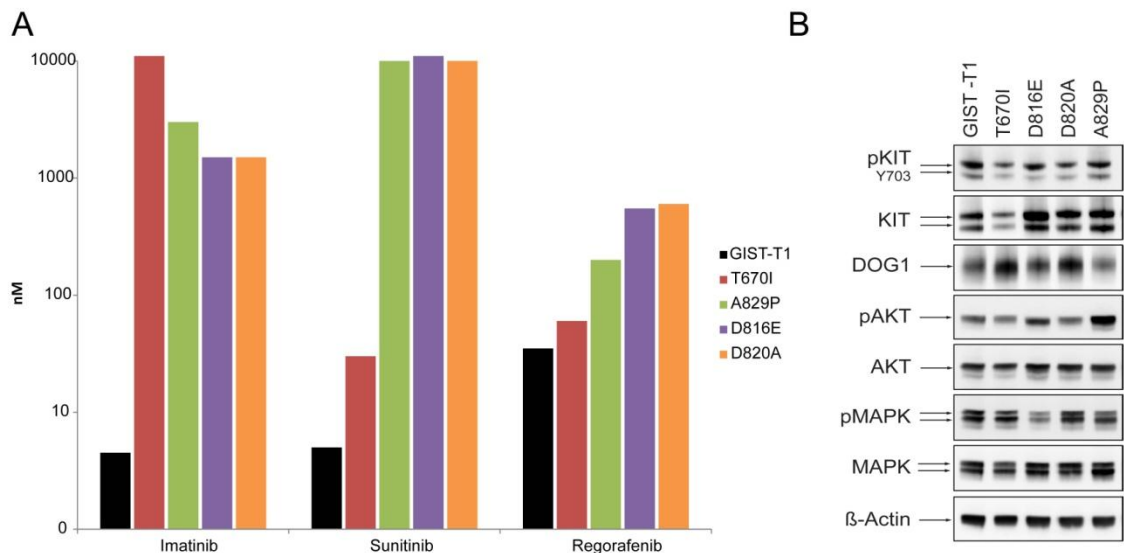


Abbildung 13: IC_{50} -Werte von drei Kinase-Inhibitoren getestet in allen fünf GIST-T1 Zelllinien (A). Untersuchung der Proteinexpression mittels Western Blot (B).

Außerdem wurden Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP) -Analysen von allen vier GIST-T1 Sublinien durchgeführt und mit den Daten der parentalen GIST-T1 Zelllinie verglichen. Vergleicht man die Kopienzahlvariationen (CNV) ergibt sich ein Homologiegrad von 87,5 % bis 95,6 % zur parentalen Linie, wobei GIST-T1^{T670I} mit 87,5 % den niedrigsten Wert und GIST-T1^{D820A} mit 95,6 % die höchste Homologie aufweisen.

3.3.1. Etablierung eines Modells der genomischen Heterogenität bei GIST

Zunächst wurden die GIST-T1 Sublinien mit Hilfe lentiviraler Partikel, die verschiedene Fluoreszenzfarbstoffsequenzen (GFP, mCherry, amCyan) enthielten, farblich codiert. Dadurch war es möglich, die verschiedenen GIST-T1 Zelllinien im Durchflusszytometer voneinander zu trennen und zu quantifizieren. In Abbildung 14A ist eine solche Auftrennung einer Mischkultur, bestehend aus vier verschiedenen GIST-T1 Zelllinien, als Dotplot-Grafik dargestellt. Auch immunhistochemisch konnte zwischen den GFP-markierten GIST-T1 Zellen und den unmarkierten GIST-T1 Zellen unterschieden werden. Diese Methode wird derzeit durch das Fehlen geeigneter Antikörper gegen die anderen Fluoreszenzproteine limitiert.

Die Färbung zeigt einen Gewebeschnitt eines Xenografttumors, der entstanden ist

aus einer Zellsuspension, die zu 90 % aus parentalen GFP-markierten GIST-T1 Zellen und zu 10 % aus unmarkierten GIST-T1^{D816E} Zellen bestand. In der GFP-Färbung ist ein noduläres Wachstum der unmarkierten Zellen (bläuliche Färbung) deutlich zu erkennen (Abb. 14B).

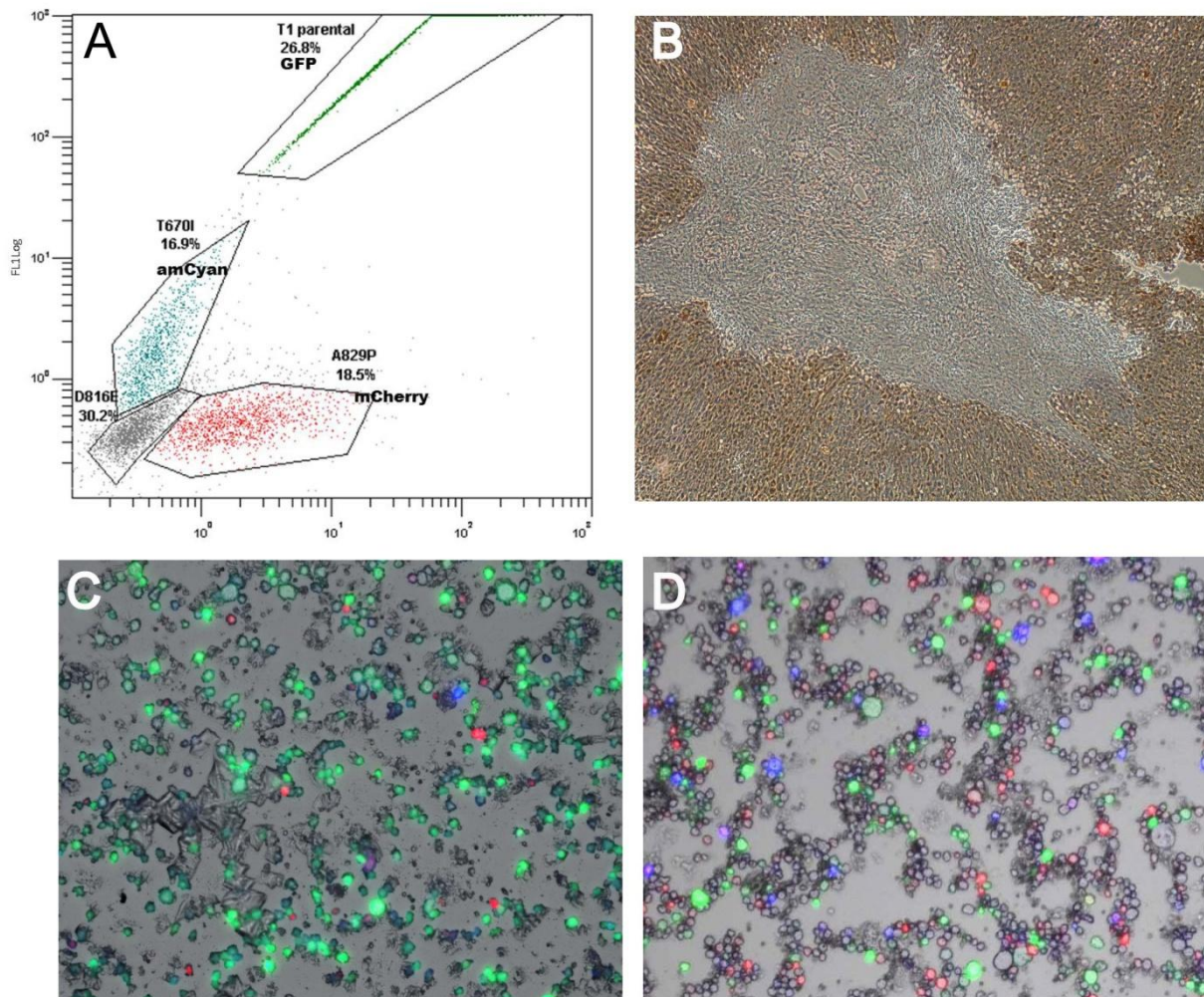


Abbildung 14: Dotplot-Graph von vier isogenen GIST-T1 Zelllinien nach Durchflusszytometrischer Analyse (A). Immunhistochemische Analyse von GFP bei einem GIST-T1/GIST-T1^{D816E}-Xenografttumor (B). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von enzymatisch verdauten Xenografttumoren ohne (C) und mit (D) kontinuierlicher Imatinib-Behandlung über das Trinkwasser.

Durch die farbliche Codierung der Zellen konnten die Wachstumskinetiken der einzelnen GIST-T1 Zelllinien in Mischtumoren, mit und ohne Imatinib-Behandlung, *ex vivo* ausgewertet werden. Die injizierte Tumorzellsuspension enthielt 70 % parentale GFP-markierte GIST-T1 Zellen und jeweils 10 % der isogenen Sublinien GIST-T1^{T670I} (Cyan-markiert), GIST-T1^{A829P} (Cherry-markiert) und GIST-T1^{D816E} (unmarkiert). Die

unbehandelten Tiere wurden aufgrund ihrer Tumorgößen bereits nach 21 Tagen erlöst. Die mediane Tumorratio lag bei 1795 mm² und die mediane Verdopplungszeit der Tumoren lag bei 3,9 Tagen. Die Imatinib-Gruppe wurde erst nach 35 Tagen erlöst, wobei die mediane Tumorratio bei 1236 mm² und die mediane Verdopplungszeit bei 7,3 Tagen lag. Die Quantifizierung der enzymatisch-verdauten Xenografttumoren am Fluoreszenzmikroskops ergab, dass sich die Zusammensetzung der behandelten Tumoren im Vergleich zu den unbehandelten Tumoren stark zu Gunsten der Sublinien verschoben hatte (Abb. 14C und D). Der prozentuale Anteil der parentalen Zellen und der einzelnen Sublinien der unbehandelten Tumoren war wie folgt verteilt 80 % parentale GIST-T1 Zellen und 3 % jeder Sublinie. Die Imatinib-behandelten Tumoren hingegen waren folgendermaßen zusammengesetzt: 14 % parentale GIST-T1, 38 % GIST-T1^{T670I}, 22 % GIST-T1^{A829P} und 18 % GIST-T1^{D816E}. Apoptotische Zellen wurden in die prozentuale Verteilung nicht mit eingerechnet.

3.4 Untersuchung von DOG1 als therapeutische Zielstruktur

3.4.1 KIT und DOG1 sind coexprimiert in GIST-Zelllinien

Transkriptom-Sequenzanalysen haben gezeigt, dass parentale KIT-positive GIST-Zelllinien im Vergleich mit isogenen KIT-negativen Sublinien nicht nur eine Reduktion von KIT, sondern auch eine starke Reduktion von DOG1 aufweisen (Simon et al. 2013).

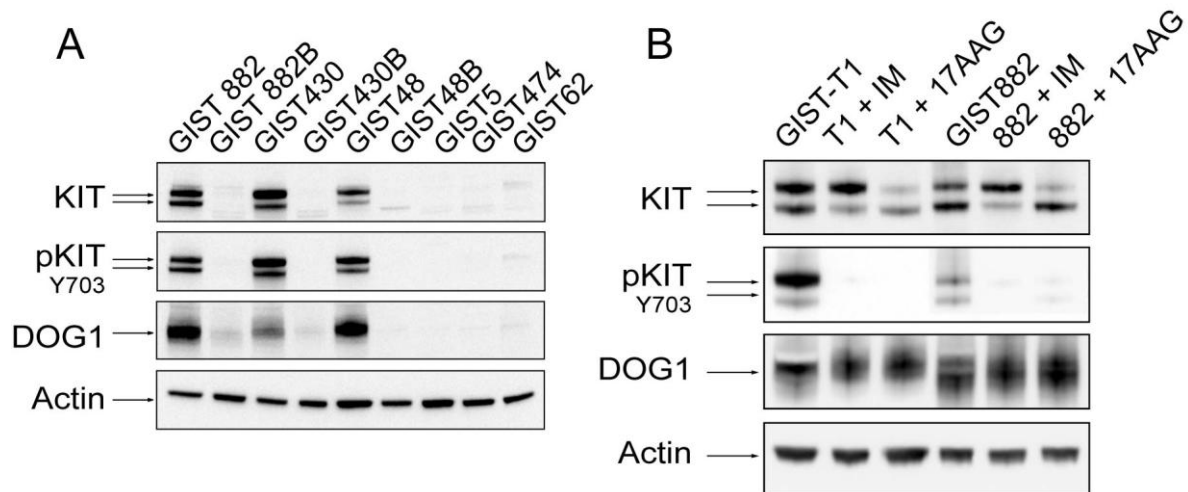


Abbildung 15: Vergleich der Proteinexpression der parentalen KIT-positiven GIST-Zelllinien und der dazugehörigen KIT-negativen Sublinien (A). Spezifische Inhibition von KIT mit 1 μ M Imatinib und unspezifische Kinase-Hemmung mit 0,5 μ M 17AAG (B).

Western Blot-Analysen von KIT-positiven Zelllinien und ihren KIT-negativen Sublinien konnten diese Beobachtungen bestätigen. In Abbildung 15 sind drei KIT- und DOG1-positive GIST-Zelllinien (GIST882, GIST430 und GIST48) mit ihren KIT- und DOG1-negativen Sublinien zu sehen (GIST882B, GIST430B und GIST48B). Die DOG1-Proteinlevel der KIT-negativen Sublinien waren um 83-99 % reduziert. Außerdem konnte beobachtet werden, dass drei primär KIT-negative GIST-Zelllinien GIST5, GIST474 und GIST62 ebenfalls primär DOG1-negativ waren.

Eine direkte pharmakologische Inhibierung von KIT mit 1 μ M Imatinib oder eine indirekte pharmakologische Inhibierung von KIT mit 0,5 μ M 17-AAG beeinflusste die DOG1-Expression in GIST-T1 oder GIST882 nicht (Abb. 15B).

3.4.2 DOG1-Knockdown hat keinen Effekt auf KIT-Expression, Zellproliferation oder Imatinib-Sensitivität von GIST-Zellen *in vitro*

Um die biologische Rolle von DOG1 in GIST-Zellen zu untersuchen, wurden GIST-T1 und GIST882 mit lentiviralen Partikeln transduziert, welche shRNAs gegen DOG1 enthielten. Der shRNA-vermittelte Knockdown von DOG1 wurde mit Hilfe von Western Blot-Analysen verifiziert. Sowohl in den GIST-T1-Zellen als auch in den GIST882-Zellen wurde ein stabiler Knockdown von 90 % erreicht. Die Expression und Aktivierung von KIT wurde durch den Knockdown in keiner der beiden Zelllinien beeinflusst. Weder die Expressionslevel des gesamten KIT-Proteins noch die Phosphorylierung waren verändert (Abb. 16)

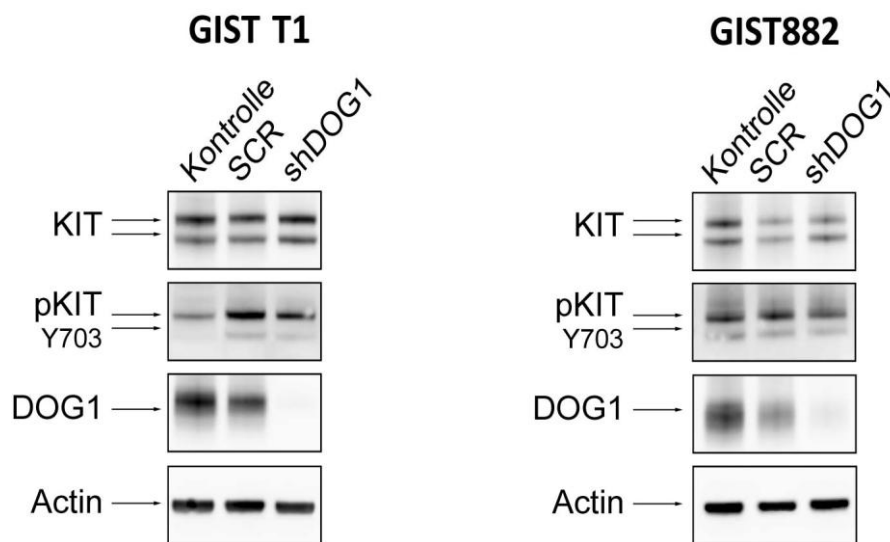


Abbildung 16: Vergleich der Proteinexpression der parentalen GIST-Zelllinie, der dazugehörigen Scrambled-Kontrollzelllinie (SCR) und shRNA-Zelllinie von GIST-T1 und GIST882 um den DOG1-Knockdown zu bestätigen.

Die Funktionalität des DOG1-Knockdowns wurde mit *Whole-Cell-Patch-Clamp*-Experimenten untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Chlorid-Efflux in den DOG1-negativen GIST-T1-Zellen um 96 % und in den DOG1-negativen GIST882-Zellen um 90 % reduziert wurde im Vergleich zu den jeweiligen Scrambled-Kontrollen (Abb. 17).

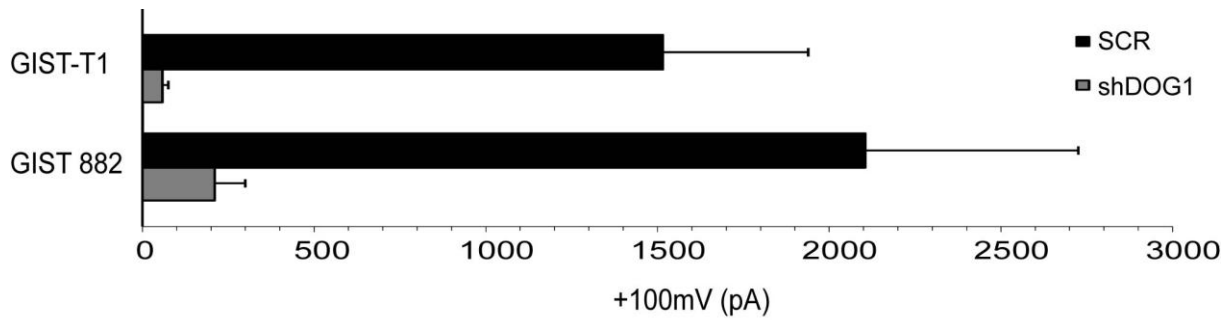


Abbildung 17: Whole-Cell-Patch-Clamp-Messungen der Scrambled-Kontrollen (SCR) und der DOG1-Knockdown Zellen von GIST-T1 und GIST882.

Der Einfluss des Knockdowns auf die Zellproliferation wurde mittels BrdU-Inkorporation untersucht. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen GIST-T1-Zellen festgestellt. Die GIST-T1-Kontrollzellen waren zu 54,5 % positiv, die GIST-T1-Scrambled-Kontrollen zu 53,3 % positiv und die GIST-T1-shRNA-DOG1-Zellen zu 50,3 % positiv. Auch bei den GIST882-Zellen wurde kein Einfluss auf das Zellwachstum beobachtet. Die GIST882-Kontrollzellen waren zu 23,5 % positiv, die GIST882-Scrambled-Kontrollen waren zu 23,3 % positiv und die GIST882-shRNA-DOG1-Zellen waren zu 27,1 % positiv (Abb. 18).

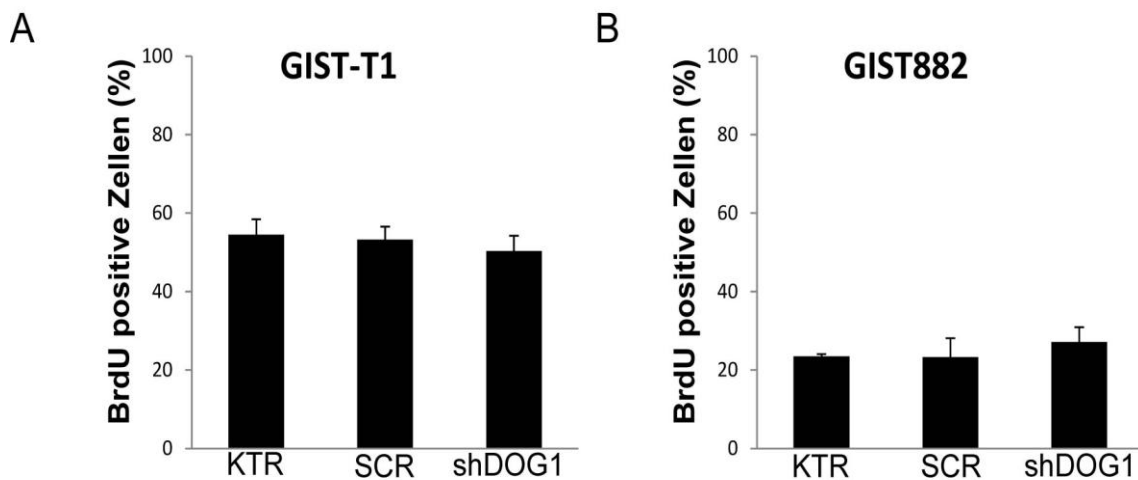


Abbildung 18: Zellproliferationsuntersuchungen über Bromdesoxyuridin (BrdU)-Inkorporation der parentalen GIST-Zelllinien (KTR), der dazugehörigen Scrambled-Kontrollzelllinien (SCR) und shRNA-Zelllinien von GIST-T1 (A) und GIST882 (B).

Die Zytotoxizitätstests zeigten keine Veränderung der Sensitivität gegenüber Imatinib. Die beiden Imatinib-sensiblen Zelllinien waren auch nach dem Knockdown unverändert sensibel mit IC_{50} -Werten von 20 nmol/L für die GIST-T1-Zellen und 50 nmol/L für die GIST882-Zellen (Abb. 19).

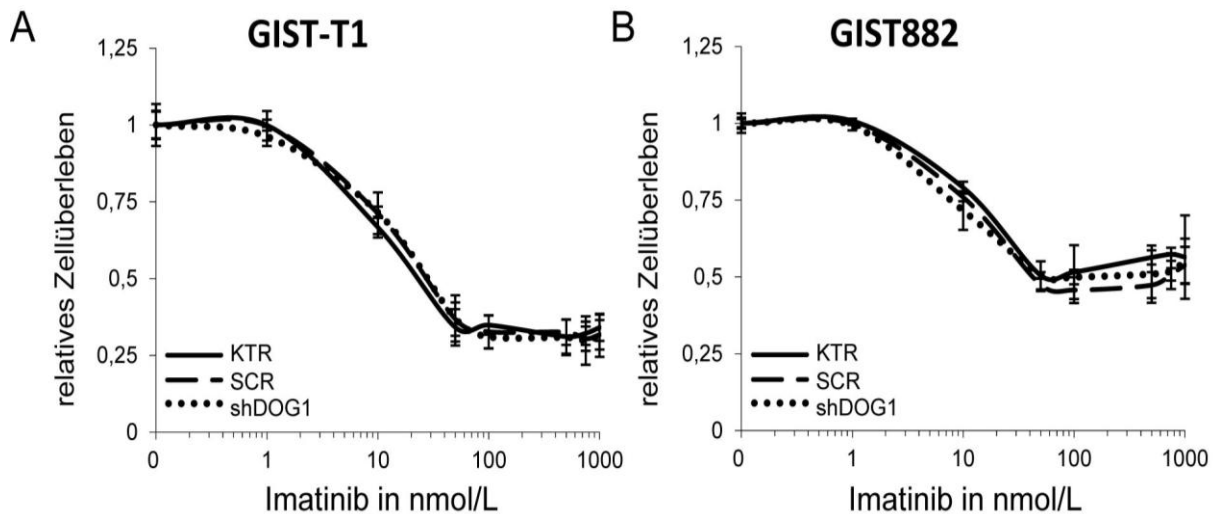


Abbildung 19: Zytotoxizitäts-Assay nach 3-Tagen mit ansteigenden Konzentrationen von Imatinib (10 nM – 10 µM) der parentalen GIST-Zelllinien, der dazugehörigen Scrambled-Kontrollzelllinien und shRNA-Zelllinien von GIST-T1 (A) und GIST882 (B).

3.4.3 Biochemische Inhibitoren von calciumaktivierten Chloridkanälen haben keinen Effekt auf die Zellproliferation von GIST-Zellen *in vitro*

Um die funktionelle Rolle von DOG1 für das Überleben von GIST-Zellen weiter zu untersuchen, wurden die beiden shRNA-DOG1-GIST-Zelllinien GIST-T1 und GIST882 und deren Scrambled-Kontrollen für 72h mit drei unterschiedlichen Chloridkanal-Inhibitoren behandelt (Wendehenne et al. 2002; Namkung et al. 2011). Nifluminsäure (Niflumic acid, NAC) ist ein bekannter Anionenkanalblocker und hemmt in hohen Konzentrationen unspezifisch Chloridkanäle. Im Zytotoxizitäts-Assay konnte nach 72h mit ansteigenden Konzentrationen von Nifluminsäure der IC_{50} -Wert in keiner Zelllinie erreicht werden. Auch konnte kein Unterschied zwischen den Kontrolllinien und den DOG1-negativen Zelllinien beobachtet werden.

Auch eine 72-stündige Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen von 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoat (NPPB), ebenfalls ein sehr potenter Anionenkanalblocker, zeigte keinerlei Anzeichen von Toxizität, der IC_{50} -Wert konnte

auch hier in keiner Zelllinie erreicht werden.

Der DOG1-spezifische Inhibitor A01, ein Aminophenylthiazol, zeigte in den GIST882-Zellen keine toxischen Effekte. In GIST-T1-Zellen konnte bei einer Konzentration von 10 µmol/L eine 34 %ige Inhibierung des Wachstums beobachtet werden. Allerdings konnte dieser Effekt sowohl in der GIST-T1-Scrambled-Kontrolle, als auch in den shRNA-DOG1-Zellen beobachtet werden und ist somit kein DOG1-spezifischer Effekt (Abb. 20).

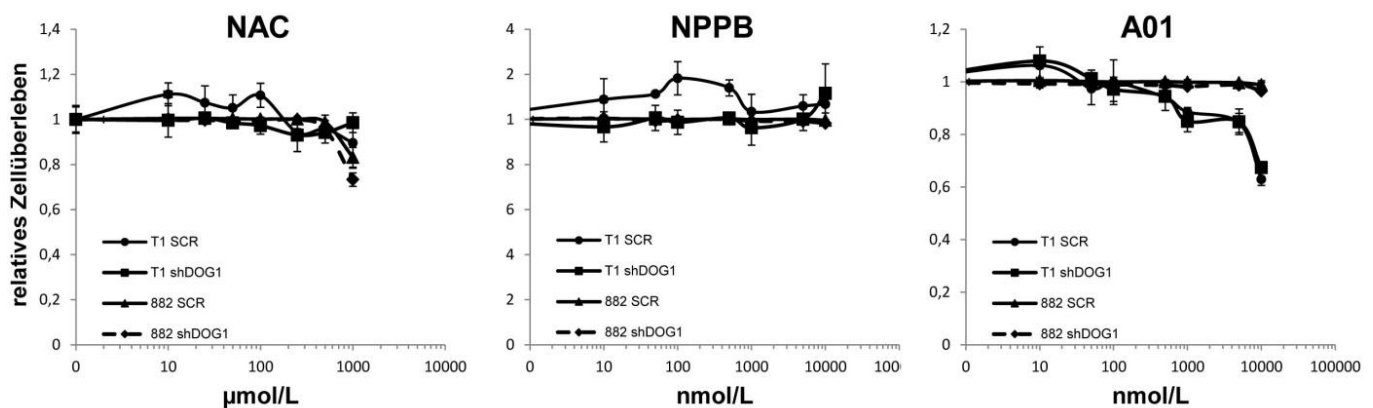


Abbildung 20: Dosis-Wirkungskurven nach 3-Tagen mit ansteigenden Konzentrationen von Nifluminsäure (NAC), 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoat (NPPB) und A01 von den Scrambled-Kontrollzelllinien und den DOG1shRNA-Zelllinien von GIST-T1 und GIST882.

3.4.4 DOG1-Knockdown inhibiert das Wachstum von GIST-T1-Xenografts

Um den Einfluss des DOG1-Knockdowns auf die Tumor-Wirt-Interaktion zu untersuchen wurden *in vivo*-Wachstumsversuche durchgeführt.

Hierbei zeigte sich interessanterweise, dass DOG1-negative GIST-T1-Xenografttumoren im Vergleich zu ihren DOG1-positiven Scrambled-Kontroll-Xenografttumoren signifikant langsamer wachsen ($p=0,003$). Die finale Tumorratio der DOG1-negativen Tumore lag nach 19 Tagen bei 427 mm² und die der Scrambled-Kontrolltumoren bei 839 mm² (Abb. 21A). Auch bei den DOG1-negativen GIST430-Xenografttumoren konnte eine Hemmung des Tumorwachstums beobachtet werden. Nach 16 Tagen lag die finale Tumorratio der DOG1-negativen Tumoren bei 286 mm² und die der Scrambled-Kontrolltumoren bei 111 mm² (Abb. 21B).

Das Wachstum der GIST882-Xenografttumoren wurde durch den DOG1-Knockdown hingegen nicht beeinflusst. Die finale Tumorratio der DOG1-negativen GIST882-Tumoren lag nach 50 Tagen bei 456 mm² und die der Scrambled-Kontrolltumoren bei 482 mm² (Abb. 21C).

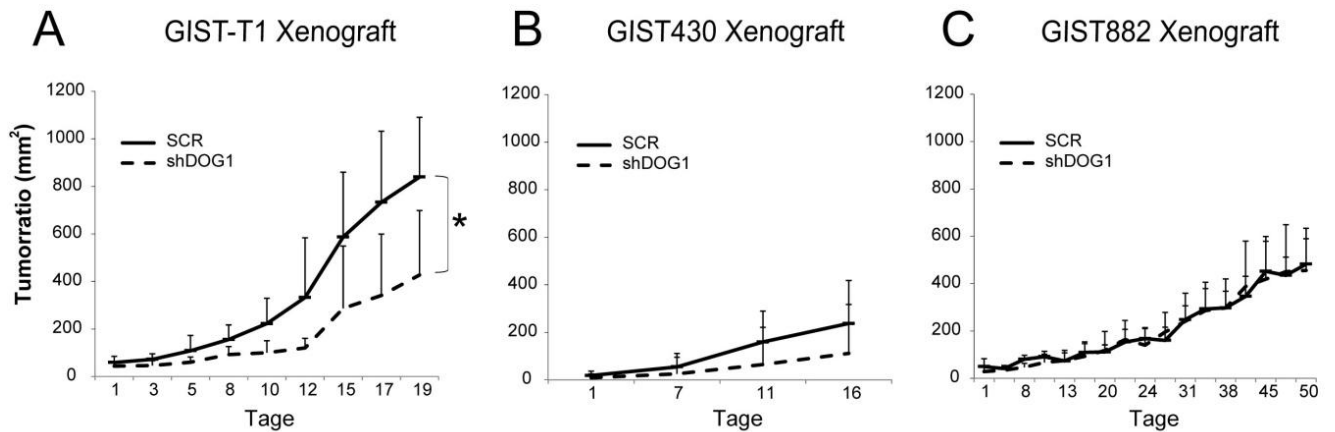


Abbildung 21: *In vivo* Wachstumskurven der Scrambled-Xenografts und der shRNA-DOG1 Xenografts von GIST-T1 (A), GIST430 (B) und GIST882 (C).

Der stabile DOG1-Knockdown in den Xenografttumoren wurde im Western Blot nachgewiesen, wobei die shRNA-DOG1-Tumoren weiterhin KIT-positiv und DOG1-negativ waren.

Die immunhistochemischen Färbungen der Tumoren bestätigten ebenfalls den DOG1-Knockdown und zeigten außerdem, dass die Proliferation in den DOG1-negativen GIST-T1-Xenografttumoren herabgesetzt war. In den GIST-T1-Kontrolltumoren waren ca. 90 % der Zellen Ki67-positiv, wohingegen in den DOG1-negativen GIST-T1-Xenografttumoren nur 60 % der Zellen Ki67-positiv waren (Abb. 22).

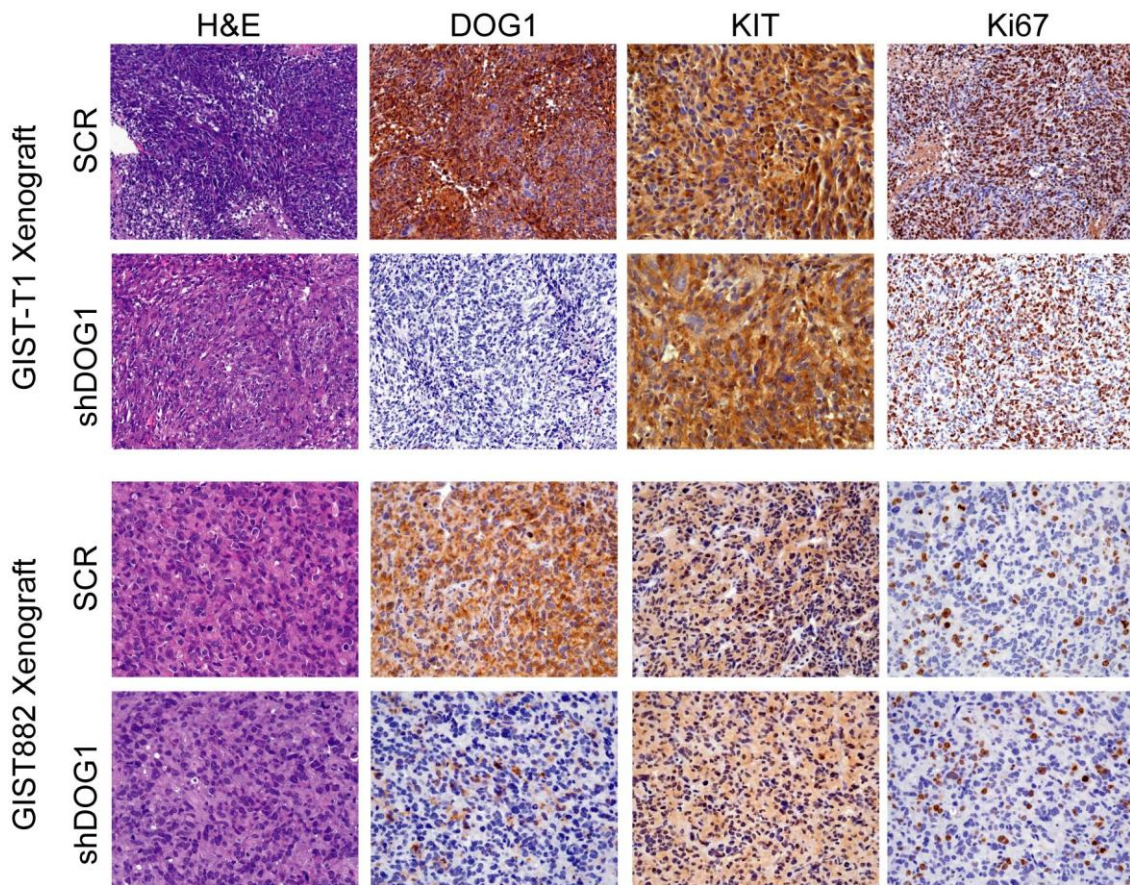


Abbildung 22: Immunhistochemische Analyse von GIST-T1 und GIST882 Xenografftumoren mit und ohne DOG1-Knockdown. Gewebeschnitte von Paraffin-fixierten Tumoren wurden mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung morphologisch untersucht. Der spezifische Nachweis von DOG1 und KIT erfolgte durch immunhistochemische Färbungen mit anti-humanen Antikörpern. Die Ki67-Färbung diente als Proliferationsnachweis.

3.4.5 Genexpressionsanalysen: IGFBP5 in DOG1-negativen Zellen und Xenografftumoren hochreguliert

Um die molekularen Konsequenzen eines DOG1-Knockdowns in GIST-T1-Zellen zu untersuchen, wurden Genexpressionsanalysen von ca. 25.000 Genen von der shRNA-DOG1-Zelllinie und der Scrambled-Zelllinie, sowie den Xenografftumoren durchgeführt.

Es wurde der HG-U133 plus 2.0 Expression-Array von Affymetrix verwendet und mit dem Programm „Microarray Analysis Suite“ (MAS, Version 5.0) ausgewertet.

Im Vergleich zu der GIST-T1-Scrambled-Zelllinie waren in der shRNA-DOG1-Zelllinie über 1500 Gene verändert exprimiert, in GIST-T1-Xenografftumoren sogar über 3500

Gene. Wie erwartet war das DOG1-Gen in der Top20-Rangliste der veränderten Gene, sowohl in der Zelllinie, als auch im Xenografttumor zu finden und bestätigte so nochmals den erfolgreichen und stabilen Knockdown von DOG1 (Tab. 4 und 5).

Tabelle 4: Auflistung der 20 am stärksten veränderten Gene in den DOG1-negativen GIST-T1 Xenografttumoren im Vergleich zu den Scrambled-Xenografttumoren.

#	XG Scrambled vs XG shDOG1 Signal Log Ratio	Zunahme (I) Abnahme (D)	Genname	Gensymbol
1	5,5	I	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3	KCNJ3
2	5,1	I	listerin E3 ubiquitin protein ligase 1	LTN1
3	4,3	I	sphingosine-1-phosphate phosphatase 2	SGPP2
4	4,2	I	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	BUB1
5	4,1	I	zinc finger and SCAN domain containing 20	ZSCAN20
6	3,9	I	CDC14 cell division cycle 14 homolog A (S. cerevisiae)	CDC14A
7	3,8	I	SET domain, bifurcated 2	SETDB2
8	3,7	I	zinc finger protein 167	ZNF167
9	3,7	I	nuclear receptor coactivator 7	NCOA7
10	3,6	I	CUB domain containing protein 1	CDCP1
11	3,5	I	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1	MKNK1
12	3,4	I	coiled-coil domain containing 65	CCDC65
13	3,1	I	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	OASL
14	2,9	I	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3	HS6ST3
15	2,8	I	negative regulator of ubiquitin-like proteins 1	NUB1
16	2,7	I	MAX gene associated	MGA
17	2,5	I	RNA binding motif protein 5	RBM5
18	2,5	I	olfactory receptor, family 3, subfamily A, member 2	OR3A2
19	2,5	I	component of oligomeric golgi complex 2	COG2
20	2,4	I	anoctamin 1, calcium activated chloride channel	ANO1
1	-4,5	D	carboxypeptidase A6	CPA6
2	-4	D	phosphoinositide-3-kinase, class 2,	PIK3C2G

			gamma polypeptide	
3	-3,4	D	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	DDX17
4	-3,1	D	neuropilin 1	NRP1
5	-2,4	D	collagen, type XII, alpha 1	COL12A1
6	-2,1	D	RER1 retention in endoplasmic reticulum 1 homolog (S. cerevisiae)	RER1
7	-2	D	transglutaminase 2	TGM2
8	-2	D	tissue factor pathway inhibitor	TFPI
9	-2	D	LIM domain binding 3	LDB3
10	-1,9	D	interleukin 12A	IL12A
11	-1,9	D	GTPase, IMAP family member 6	GIMAP6
12	-1,8	D	lumican	LUM
13	-1,8	D	phospholipase C-like 2	PLCL2
14	-1,8	D	sestrin 3	SESN3
15	-1,8	D	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement	CD55
16	-1,7	D	delta-like 1 homolog (Drosophila)	DLK1
17	-1,7	D	decorin	DCN
18	-1,7	D	insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5
19	-1,6	D	EPH receptor A4	EPHA4
20	-1,6	D	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa	CTNNA1

Tabelle 5: Auflistung der 20 am stärksten veränderten Gene in der DOG1-negativen GIST-T1 Zelllinie im Vergleich zu der Scrambled-Kontrolle.

#	shDOG1 vs. scrambled Signal Log Ratio	Zunahme (I) Abnahme (D)	Genname	Gensymbol
1	4,4	I	TOX high mobility group box family member 3	TOX3
2	3,5	I	GTPase, IMAP family member 7	GIMAP7
3	3	I	LIM domain binding 3	LDB3
4	2,5	I	zinc finger CCCH-type containing 12C	ZC3H12C
5	2,2	I	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7	DHRS7
6	2	I	ADAM metalloproteinase domain 7	ADAM7
7	2	I	pre-B lymphocyte 1	VPREB1
8	1,8	I	HRAS-like suppressor	HRASLS

9	1,6	I	interleukin 12A	IL12A
10	1,6	I	phosphoinositide-3-kinase, class 2, gamma polypeptide	PIK3C2G
11	1,6	I	GTPase, IMAP family member 4	GIMAP4
12	1,6	I	caspase recruitment domain family 9	CARD9
13	1,5	I	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7	MS4A7
14	1,5	I	testin-related protein TRG	LOC10012886
15	1,5	I	paired box 7	PAX7
16	1,4	I	thioredoxin-related transmembrane protein 4	TMX4
17	1,4	I	insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5
18	1,4	I	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2	CRISPLD2
19	1,4	I	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1	IGF2BP1
20	1,4	I	uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	UACA
1	-4,7	D	MRS2 magnesium homeostasis factor	MRS2
2	-4,2	D	Arachidonate 5-lipoxygenase	ALOX5
3	-2,9	D	anoctamin 1, calcium activated chloride channel	ANO1
4	-2,9	D	Neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor	NSMAF
5	-2	D	inscuteable homolog (Drosophila)	INSC
6	-1,9	D	complement component 7	C7
7	-1,9	D	protocadherin 17	PCDH17
8	-1,7	D	XIAP associated factor 1	XAF1
9	-1,6	D	matrix metalloproteinase 1	MMP1
10	-1,6	D	matrix metalloproteinase 8	MMP8
11	-1,6	D	4-aminobutyrate aminotransferase	ABAT
12	-1,4	D	interferon, alpha-inducible protein 27	IFI27
13	-1,4	D	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	HSD11B1
14	-1,4	D	runt-related transcription factor 1	RUNX1T1
15	-1,4	D	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	ENPP2
16	-1,4	D	dickkopf homolog 2 (Xenopus laevis)	DKK2
17	-1,4	D	suppressor of fused homolog	SUFU

18	-1,4	D	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1	MALAT1
19	-1,3	D	nicotinamide N-methyltransferase	NNMT
20	-1,3	D	guanylate binding protein 1	GBP1

Um die Ergebnisse der Genexpressions-Arrays zu validieren, wurden qRT-PCRs von sieben Kandidatengenen durchgeführt, die zu den 40 am stärksten veränderten Genen gehörten und laut Literaturrecherche sowohl Krebs-assoziiert als auch in Proliferation und/oder Apoptose involviert waren.

Jedoch konnte nur für *IGFBP5* eine deutliche Erhöhung des Genexpressionslevels in der qRT-PCR bestätigt werden (Abb. 23). Das an GIST-T1-Scrambled-Kontrolltumoren normalisierte Expressionslevel von *IGFBP5* war in GIST-T1-shRNA-DOG1-Tumoren um ein 3faches höher. Wie erwartet war das KIT-Expressionslevel unverändert und das DOG1-Expressionslevel deutlich erniedrigt. Die anderen Kandidatengene waren nur minimal in ihrer Expression verändert.

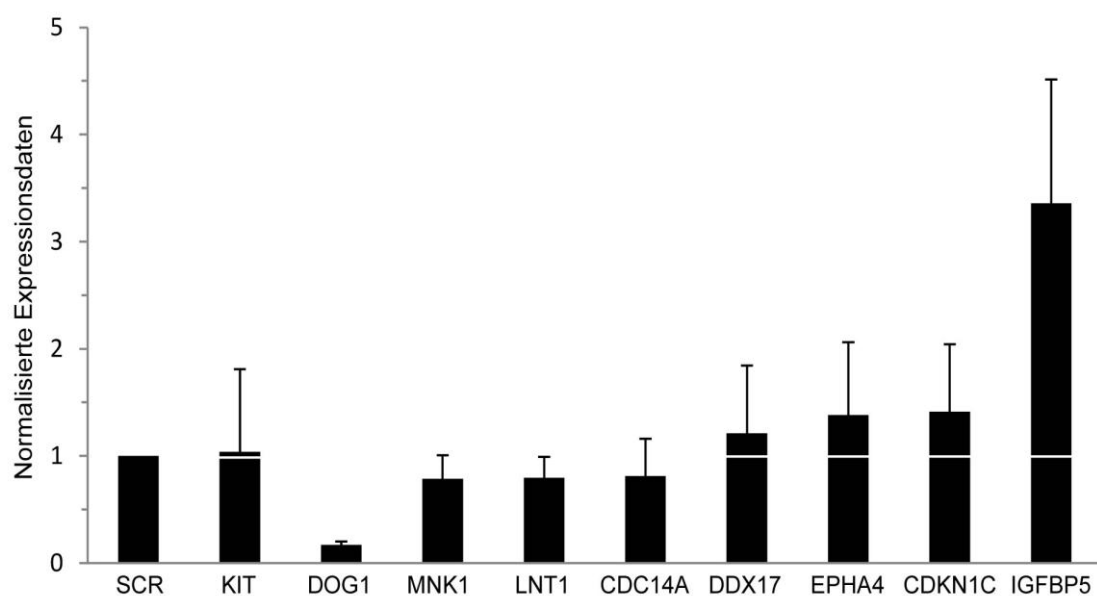


Abbildung 23: Validierung der Kandidatengene des Genexpressions-Arrays mittels quantitativer Real-Time-PCR.

In GIST882-shRNA-DOG1-Xenografttumoren konnte mittels qRT-PCR keine Erhöhung von *IGFBP5* nachgewiesen werden. Das Expressionslevel von *IGFBP5* war sogar etwas niedriger im Vergleich zu den Scrambled-Kontrolltumoren (Abb. 24).

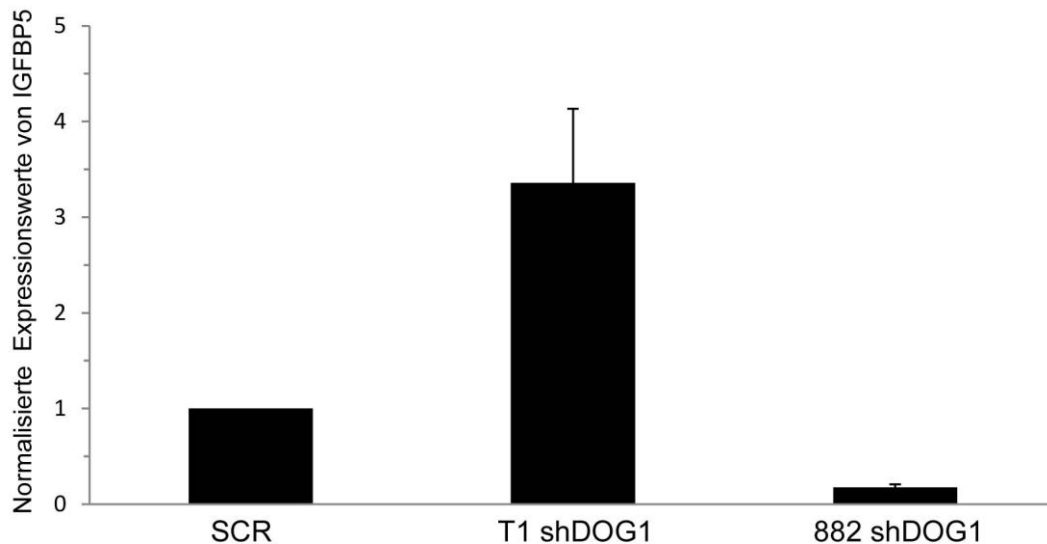


Abbildung 24: Vergleich der transkriptionellen Regulation von IGFBP5 in DOG1-negativen GIST-T1 und GIST882 Xenografttumoren mittels quantitativer Real-Time-PCR.

3.4.6 Überexpression von IGFBP5 hat weder einen Effekt auf die Zellproliferation oder auf die Imatinib-Sensitivität von GIST-Zellen *in vitro* noch auf das Tumorstwachstum *in vivo*

Um die Auswirkungen einer IGFBP5-Überexpression zu untersuchen, wurde humanes IGFBP5 in den lentiviralen Expressionsvektor pLenti kloniert. So konnten lentivirale Viruspartikel hergestellt werden, mit deren Hilfe humanes IGFBP5 in GIST-T1-Zellen eingebracht wurde.

In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass die lentivirale Transduktion von IGFBP5 in GIST-T1-Zellen zu einer signifikanten Zunahme von IGFBP5-mRNA führte, nachgewiesen mittels qRT-PCR. Um einen Effekt der lentiviralen Transduktion auf die IGFBP5-Expression auszuschließen, wurden als Negativkontrolle GIST-T1-Zellen mit dem lentiviralen Leervektor transduziert.

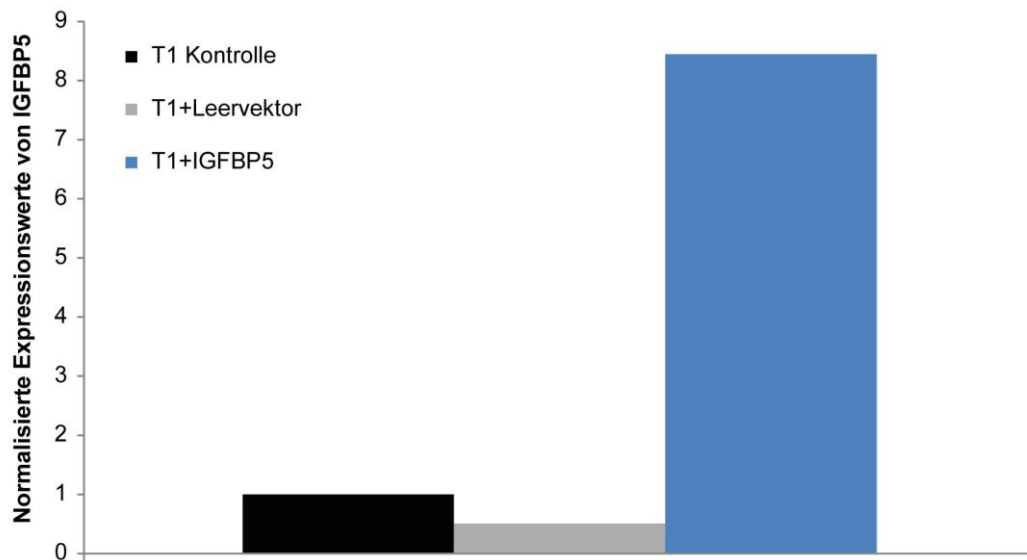


Abbildung 25: Nachweis der lentiviralen Überexpression von IGFBP5 mittels quantitativer Real-Time-PCR.

Ob IGFBP5 Einfluss auf die Proliferation und den Zellzyklus der GIST-T1-Zellen *in vitro* hat, wurde mit Hilfe von Zellzyklusanalysen am Durchflusszytometer untersucht. Hierbei ergaben sich allerdings keine Hinweise auf eine Wachstumsinhibition oder einen Zellzyklusarrest bedingt durch eine erhöhte IGFBP5-Expression (Abb. 26).

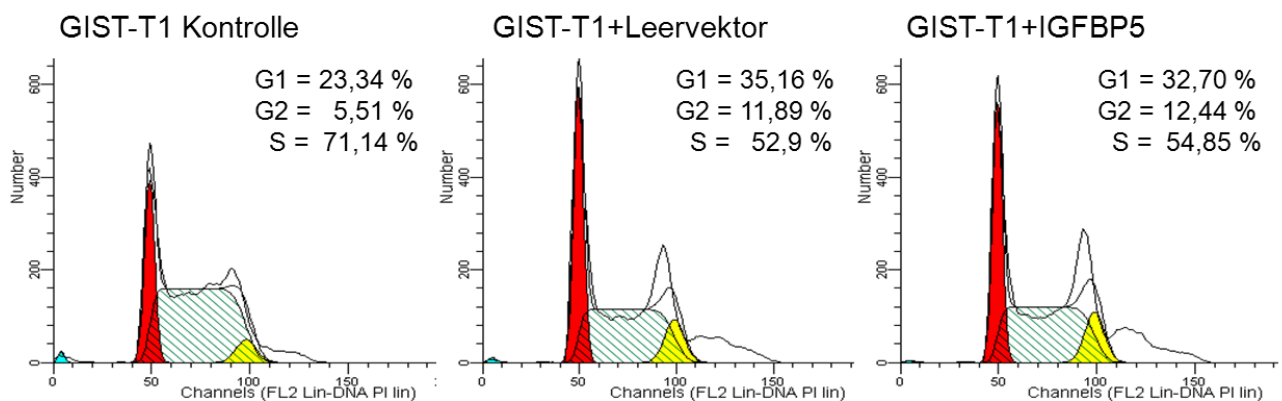


Abbildung 26: Zellzyklusanalyse von IGFBP5-überexprimierenden GIST-T1 Zellen.

Weiterhin wurde untersucht ob eine IGFBP5-Überexpression Auswirkungen auf die Imatinib-Sensitivität der GIST-T1-Zellen hat. Aber auch hier konnte keine Veränderung festgestellt werden. Der IC_{50} -Wert für Imatinib lag bei den GIST-T1-Kontrollzellen bei 20 nmol/L, bei GIST-T1-Leervektor-Zellen und GIST-T1-IGFBP5-Zellen minimal erhöht bei 30 nmol/L (Abb. 27).

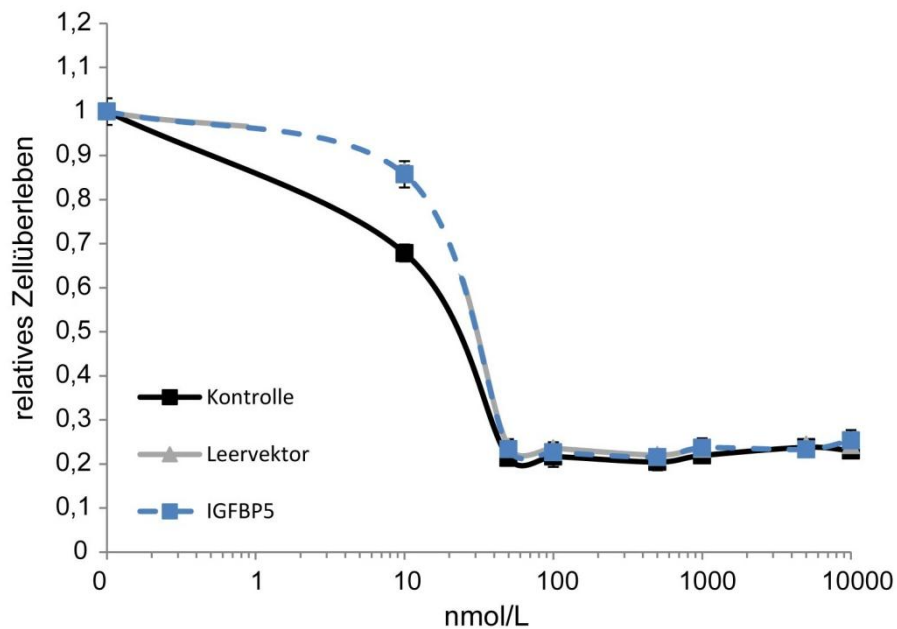


Abbildung 27: Imatinib Dosis-Wirkungsmessungen nach drei Tagen.

Da erst die *in vivo*-Experimente den wachstumshemmenden Effekt des DOG1-Knockdowns auf GIST-T1-Zellen zeigte, wurden ebenfalls *in vivo* Wachstumsuntersuchungen mit den IGFBP5-überexprimierenden GIST-T1-Zellen durchgeführt. Hierbei konnte allerdings kein Wachstumsunterschied festgestellt werden. Die mittlere Tumorratio der Leervektor-Xenografts lag nach 35 Tagen bei 134,5 mm² und die der IGFBP5-Xenografts bei 135,3 mm² (Abb. 28).

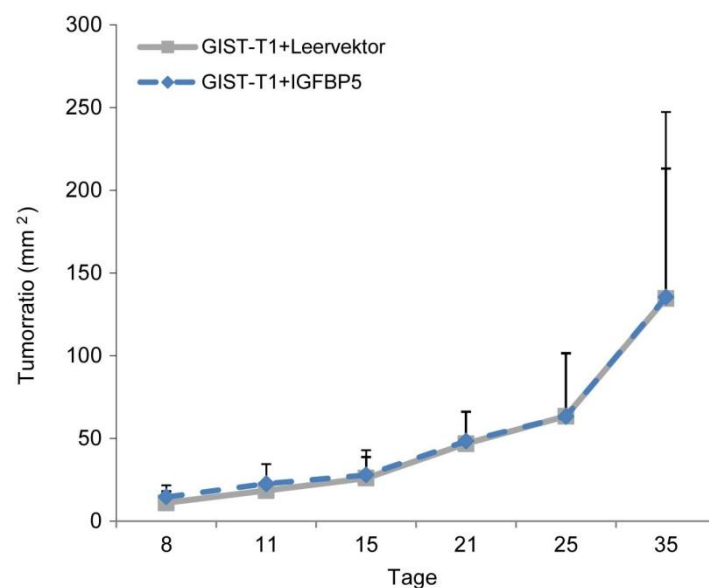


Abbildung 28: *In vivo* Wachstumskinetiken von GIST-T1 Xenografttumoren mit IGFBP5-Überexpression und der Leervektorkontrolle.

Um sicherzustellen, dass die IGFBP5-Expression auch in den Mäusetumoren vorhanden war, wurden die IGFBP5-Level der Xenografttumoren mittels qRT-PCR untersucht. Es zeigte sich eine deutliche (17-35fache) Überexpression von IGFBP5 im Vergleich zu den IGFBP5-Leveln der Leervektorkontrollen (Abb. 29).

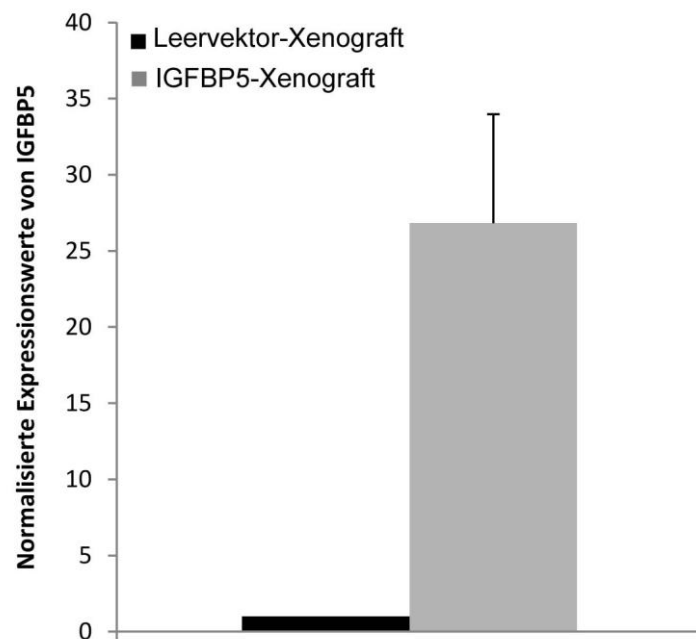


Abbildung 29: Nachweis der IGFBP5-Überexpression in den GIST-T1 Xenografttumoren mittels quantitativer Real-Time-PCR.

4. Diskussion

4.1 Etablierung neuer GIST-Modelle

Obgleich die Prävalenz metastasierter GIST durch die Einführung zielgerichteter Therapien stetig steigt, existiert nur eine sehr geringe Zahl von GIST-Modellen. Transgene Maus-Modelle für GIST zeigen zwar einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie Patienten mit familiärem GIST-Syndrom (ICC-Hyperplasie, Entwicklung multipler GIST), weisen aber in der Regel einen sehr indolenten Krankheitsverlauf auf. Als Modelle für die Medikamenten-Entwicklung sporadischer GIST werden diese daher praktisch nicht verwendet. Insbesondere die Komplexität der heterogenen Resistenz mit dem Vorhandensein multipler sekundärer Mutationen kann anhand dieser Modelle nicht rekapituliert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten vier neue, einzigartige GIST-Zell bzw. Tumorlinien etabliert werden. Zudem wurde erstmalig ein Modell der genomischen Heterogenität von GIST entwickelt, mit dessen Hilfe man das klonale Wachstum von resistenten Klonen unter Therapiebedingungen studieren kann.

Für dieses Projekt wurde Tumorgewebe, das bei Routine-Operationen von GIST-Patienten asserviert wurde, systematisch *in vitro* und *in vivo* kultiviert. Von den 20 Patientenproben konnte ein Anwachsen bei 50% der Proben erzielt werden. Nur bei vier Xenografts gelang eine mehrmalige Transplantation und davon ließen sich zwei stabile Tumorlinien etablieren. Offensichtlich sind die bislang verfügbaren Kultivierungsbedingungen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, für eine höhere Anwachsrate nicht geeignet. Dies erklärt auch die Tatsache, dass bislang weltweit nur vier KIT-positive GIST-Zelllinien etabliert werden konnten.

In dieser Arbeit gelang es, eine neue Imatinib-resistente GIST-Zelllinie (AZ38) zu entwickeln, die eine sekundäre Exon 17 Mutation aufweist. Im Gegensatz zu den bekannten Linien GIST882, GIST48, GIST430 und GIST-T1 steht für diese Linie auch Gewebe des Primärtumors zur Verfügung. Dadurch können zukünftig mögliche genetische Veränderungen, die am Primärtumor entdeckt werden, funktionell validiert werden. Die bei der AZ38-Linie vorhandene Sekundärmutation D820G gehört zu den häufigsten klinisch beobachteten Sekundärmutationen und ist somit translational

relevant. Sie lässt sich durch Regorafenib hemmen und könnte damit auch für die Identifikation von Resistenzmechanismen zur Regorafenib-Resistenz eingesetzt werden (Demetri et al. 2013; Heinrich et al. 2008a). AZ38 wächst stabil als Imatinib-resistentes Xenograft-Transplantationsmodell. Im Vergleich zu den ebenfalls Imatinib-resistenten GIST48-Xenografts (D820A-Resistenzmutation) weist AZ38 eine deutlich geringere Verdopplungsrate (*in vivo*) von 8 Tagen im Vergleich zu 39 Tagen bei GIST48 auf. Dies erlaubt die deutlich schnellere Vorbereitung und Durchführung von *in vivo* Experimenten.

Die hier beschriebene Etablierung der Tumor-Linie GIST-NS72 stellt einen Meilenstein dar, da es sich um die bislang weltweit erste GIST-Linie aus einem Patienten mit Neurofibromatose-Typ I (NF1) handelt. NF1, oder Morbus Recklinghausen, ist eine der häufigsten autosomal-dominant vererbten Multiorganerkrankungen. Die Inzidenz beträgt 1:3000, wobei es sich bei der Hälfte der Fälle um spontane Neumutationen handelt. Auslöser der Erkrankung ist eine „loss-of-function“-Mutation des Tumorsuppressor-Gens *NF1*, welches sich auf dem Chromosom 17q11.2 befindet (Ferner 2007). NF1 Patienten haben, im Vergleich zur Normalbevölkerung, ein 45-fach höheres Risiko an GIST zu erkranken. Bei 3,9-25 % der NF1 Patienten treten im Verlauf der Erkrankung multiple GIST auf, von denen die meisten asymptomatisch sind. Lediglich 5 % der NF1 GIST sind symptomatisch und müssen behandelt werden, wobei sie dann häufig eine hohe Mortalität aufweisen. Im Gegensatz zu sporadischen GIST finden sich in NF1 assoziierten GIST keine aktivierenden KIT-Mutationen sondern lediglich eine erhöhte KIT-Expression. Mithilfe von KIT-Inhibitoren wie Imatinib und Sunitinib lassen sich in der Regel keine Remissionen sondern nur vorübergehende Krankheitsstabilisierungen erzielen (Patil and Chamberlain 2012) (Miettinen et al. 2006) (Bauer - persönliche Kommunikation). Das NS72-Xenograftmodell zeigt eine spindelförmige Morphologie und ist ebenfalls KIT- und DOG1-positiv. Eine Kultivierung der NS72-Zellen gelang bereits über mehr als 10 Passagen (Daten nicht gezeigt), so dass in Kürze möglicherweise auch eine stabile Zelllinie zur Verfügung steht. Dieses Modell bietet zum ersten Mal die Möglichkeit, die Relevanz dieser genetischen Veränderungen funktionell zu untersuchen.

GIST-T1 ist die bislang einzige Imatinib-sensible Zelllinie, die eine aktivierende

Mutation von KIT-Exon 11 aufweist. Unter Selektionsdruck mit Imatinib gelang den Arbeitsgruppen von Jonathan Fletcher und Brian Rubin die Etablierung Imatinib-Resistenter GIST-T1 Sublinien, die Sekundärmutationen von KIT Exon 14 (T670I)(Gupta et al. 2010) und Exon 17 (A829P)(Heinrich et al. 2012) aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit gelang nun die Etablierung zweier weiterer Sublinien, die Mutationen in KIT Exon 17 (D816E sowie D820A) aufweisen. Insbesondere die D816E-Mutation geht mit einer ausgeprägten Resistenz gegenüber Imatinib, Sunitinib und auch Regorafenib einher (Abb.13A). Mit dieser Sublinie steht damit erstmalig diese Mutation in einem zellulären GIST-Kontext zur Verfügung.

Interessanterweise finden sich auch bei weit fortgeschrittenen, unbehandelten metastasierten GIST lediglich primäre aktivierende Mutationen (Heinrich et al. 2003a). Ähnlich wie bei der CML (Shah et al. 2002) geht man auch bei GIST davon aus, dass sekundäre Mutationen bereits vor Einleitung einer Therapie vorhanden sind und dass es erst unter KIT-inhibitorischer Therapie zu einer Selektion von Klonen kommt, bei denen sich dann mit herkömmlicher Sanger-Sequenzierung Sekundärmutationen nachweisen lassen. Im Rahmen hoch-auflösender Sequenzierungen unbehandelter GIST-Metastasen konnten allerdings bereits in sehr geringen Mengen Resistenzmutationen nachgewiesen werden (persönliche Kommunikation J. Fletcher, Boston). Offensichtlich führen diese Mutationen jedoch nicht zu einem Selektionsvorteil gegenüber GIST-Zellen, die nur eine Primärmutation aufweisen. Es konnte in diesem Zusammenhang bereits gezeigt werden, dass sekundäre Mutationen – ähnlich wie bei EGFR-mutierten Lungenkarzinomen, zu einer Hyperaktivierung der KIT-Kinase führen können (Bauer et al. 2007) (Chmielecki et al. 2011). Verschiedene Beobachtungen legen nahe, dass diese Mutationen zu „onkogenem Stress“ führen können und entsprechend zu einem verlangsamten Tumorwachstum. So konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass die Imatinib-resistenten GIST-T1 Sublinien unter Imatinib-Entzug deutlich langsamer als parentale, Imatinib-sensible GIST-T1 wachsen. Die Kultivierung in Imatinib-haltigem Medium sowie eine Behandlung Tumor-tragender Mäuse mit Imatinib führten zu einer signifikanten Beschleunigung der Proliferation (Abb. 10).

Je nach Art der Sekundärmutation findet sich eine individuell ausgeprägte Resistenz

gegenüber Imatinib. Entsprechend können unter Selektionsdruck mit einer festen Imatinib-Dosierung unterschiedliche Wachstumsraten verschiedener resistenter Klone erwartet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die fünf isogenen GIST-T1 Linien mit verschiedenen Fluorophoren transduziert (Abb. 14A). Mischkulturen (*in vitro* und *in vivo*) können so mithilfe von Durchflusszytometrie, Fluoreszenzmikroskopie und Immunhistochemie hinsichtlich der individuellen Populationskinetiken mit und ohne den Selektionsdruck verschiedener Medikamente untersucht werden.

Dieses Modell bietet erstmals die Möglichkeit, verschiedene Behandlungsschemata, z.B. metronomische Therapien, zu testen, mit dem Ziel die Ausbildung bzw. das Wachstum der resistenten Klone zu verhindern oder zu verzögern. Durch eine gezielte Änderung der Mischungsverhältnisse der verschiedenen Klone lassen sich dadurch auch verschiedene „Stadien“ der Resistenz rekapitulieren (Abb. 30). Interessanterweise zeigte sich in den ersten Xenografttumoren mit Mischpopulationen keine „Mosaik“-Verteilung der einzelnen Klone sondern ein noduläres Wachstum von resistenten Zellen, ähnlich der klinischen Situation (Abb. 14B).

Abbildung 30 zeigt schematisch, wie das o.g. Resistenz-Modell die klinische Situation rekapitulieren könnte. Dabei stehen die verschiedenen Zellfarben für die unterschiedliche Zusammensetzung von Tumorknoten mit heterogenen, resistenten Subpopulationen. Während in unbehandelten GIST (Abb. 30A) die sensiblen, parentalen GIST-Zellen die dominante Population darstellen, führt ein kontinuierlicher Selektionsdruck, wie er in der Primärtherapie von GIST unter Imatinib besteht, zwar zu einer Remission mit Schrumpfung der Tumoren, allerdings fördert dieser auch gleichzeitig eine relative Zunahme der resistenten Klone. Diese verdrängen dann im weiteren Verlauf der Therapie die sensiblen parentalen Zellen nahezu komplett.

Durch eine Modulation des Selektionsdruckes (Abb. 30 C, D und E) könnte der Wachstumsvorteil von Klonen mit sekundären Resistenzmutationen verringert werden, wie z.B. bei metronomischen Therapien. Mithilfe dieses Modells könnten in weitergehenden Versuchen zudem verschiedene Inhibitoren in Sequenz oder

Kombination an einer heterogenen Population untersucht werden.

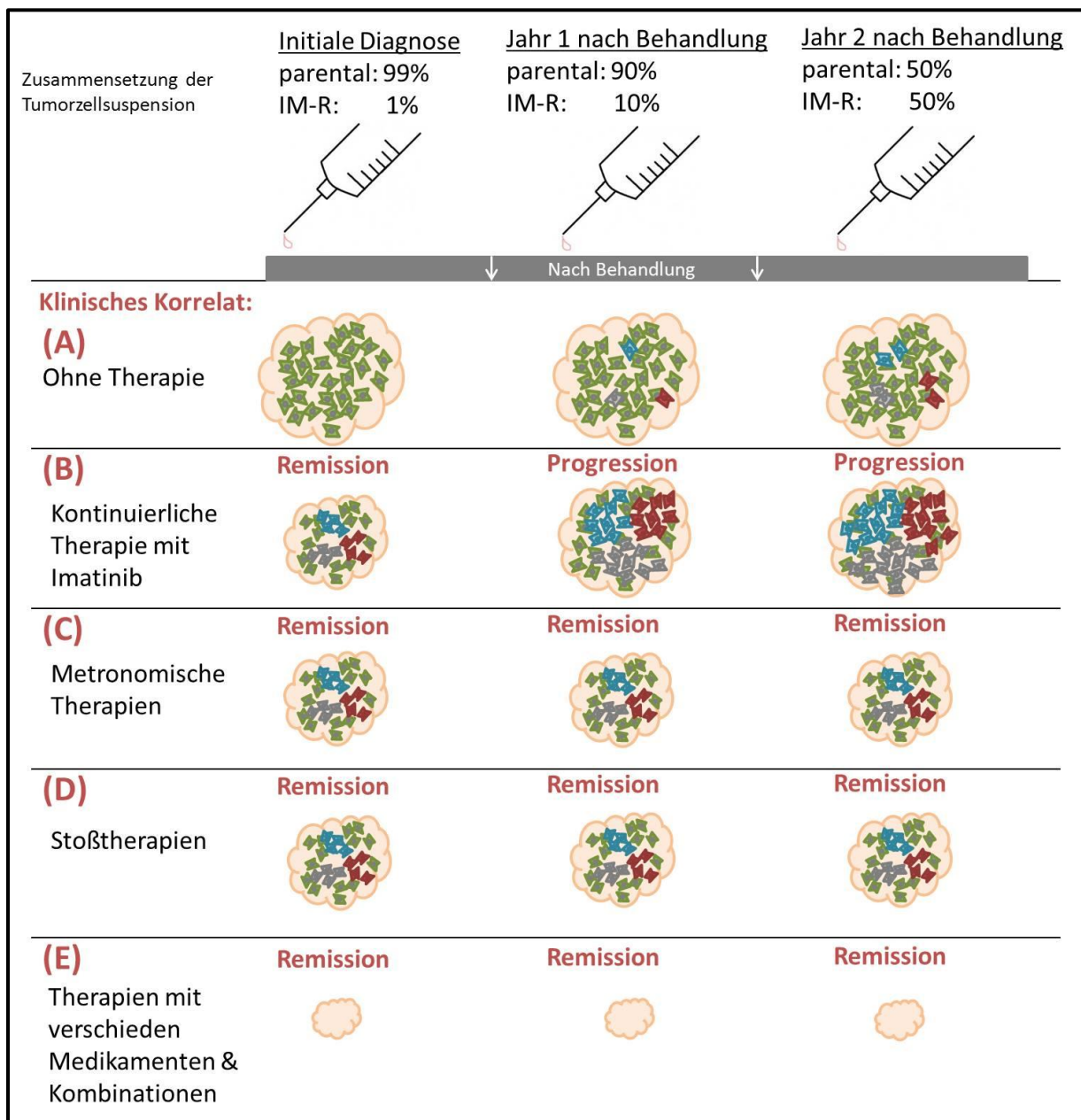


Abbildung 30: Schematische Darstellung verschiedener Behandlungsstrategien basierend auf dem etablierten Xenograftmodell der genomischen Heterogenität. In der obersten Reihe sind die verschiedenen Mischverhältnisse der Zellsuspensionen zum Zeitpunkt der Injektion abgebildet. Die Spalten A bis E zeigen erwartete Ergebnisse verschiedener Behandlungsverläufe in verschiedenen klinische Situationen (Erstdiagnose, ein bzw. zwei Jahre nach Behandlung). Die Imatinib-sensitiven Tumorzellen sind grün dargestellt, die Imatinib-resistenten Tumorzellen rot, blau und grau.

4.2 Untersuchung von DOG1 als therapeutische Zielstruktur

Mit der Einführung von Imatinib wurde die Behandlungsoption von GIST-Patienten revolutioniert. Über 80 % der GIST-Patienten mit aktivierenden KIT-Mutationen profitieren von der Imatinib-Behandlung mit einem progressionsfreien Überleben von 12 bis 24 Monaten (Heinrich et al. 2008b). Im Verlauf der Imatinib-Therapie entwickeln die GIST-Patienten allerdings eine Resistenz gegenüber Imatinib und werden progredient.

Pathologische und genetische Untersuchungen von GIST-Metastasen, entstanden unter Imatinib-Therapie, haben gezeigt, dass die Hauptursache der erworbenen Imatinib-Resistenz sekundäre KIT-Mutationen sind. Allerdings wurden auch GIST-Metastasen ohne nachweisbare KIT-Expression gefunden. Das Wachstum dieser KIT-negativen Metastasen lässt auf unbekannte, KIT-unabhängige onkogene Mechanismen schließen (Bauer et al. 2005). Auch in der Zellkultur konnte ein ähnliches Phänomen beobachtet werden, einige GIST-Zelllinien proliferieren trotz Verlust der KIT-Expression weiter.

Obwohl DOG1 bereits 2004 in einer Microarray-Studie als in GIST signifikant überexprimierter calcium-aktivierter Chloridkanal entdeckt wurde (West et al. 2004), wurde DOG1 bis heute noch nie als mögliche therapeutische Zielstruktur untersucht. Die simultane Expression von KIT und DOG1 in 95 % aller GIST und besonders die DOG1-Expression in KIT-negativen GIST, haben DOG1 zu einem wertvollen diagnostischen Marker in der Pathologie werden lassen (Liegl et al. 2009; Miettinen et al. 2009).

Interessanterweise sind 64 % der KIT-negativen GIST auch DOG1-negativ (Liegl et al. 2009). Wie in Abbildung 15A zu sehen, konnte auch in drei primär KIT-negativen GIST-Linien weder eine KIT-Expression noch eine DOG1-Expression nachgewiesen werden. Auch GIST-Zelllinien, die erst im Laufe ihrer Kultivierung die KIT-Expression verloren haben, sind DOG1-negativ (Abb. 15A). Eine pharmakologische Inhibition von KIT durch Imatinib hingegen beeinflusst die DOG1-Expression weder bei Patienten noch *in vitro* (Abb. 15B).

Diese Beobachtungen lassen auf eine eventuelle Co-Regulation von KIT und DOG1 schließen. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit DOG1 als

mögliche therapeutisch sinnvolle Zielstruktur untersucht.

Es wurde bereits untersucht, ob die erhöhte Expression von DOG1 in GIST und in den GIST-Vorläuferzellen, den interstitiellen Zellen von Cajal, aufgrund von Mutationen im *DOG1*-Gen (*Ano1*) hervorgerufen werden. Allerdings konnten keine Mutationen nachgewiesen werden und können somit als mögliche Ursache ausgeschlossen werden (Miwa et al. 2008; Chen et al. 2007; Gomez-Pinilla et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass ein DOG1-Knockdown in GIST-Zelllinien zwar einen erheblichen Einfluss auf den Chloridflux, nicht aber auf die Proteinexpression oder Aktivierung von KIT hat (Abb. 16 und 17). Auch konnte gezeigt werden, dass der Verlust oder die biochemische Inhibition von DOG1 *in vitro* nicht für Imatinib sensibilisiert oder das Zellwachstum beeinflusst (Abb. 18-20). Dies lässt darauf schließen, dass DOG1 in diesen *in vitro* Modellen keine Schlüsselrolle bei der Regulation von KIT oder der Zellproliferation zukommt. Die Reduzierung des Chloridfluxes hingegen verdeutlicht, dass die Chloridkanal-Funktion von DOG1 durch den Knockdown drastisch inhibiert wird und für die Chlorid-Homöostase funktionell relevant ist.

Interessanterweise hatte der DOG1-Knockdown eine substanzielle Wachstumsinhibition von GIST-T1 und GIST430 Xenografttumoren zur Folge (Abb. 21). Der fehlende Effekt bei GIST882 Xenografts legt allerdings nahe, dass DOG1 nur in bestimmten GIST Subgruppen eine regulatorische Rolle übernimmt.

Mögliche Ursachen dafür, dass DOG1 *in vitro* keinen Einfluss auf die Proliferation in einer Monolayerkultur hatte, könnten die weitaus komplexere Zell-Zell-Interaktion der Tumorzellen in einem dreidimensionalen Tumor sowie eine Tumor-Host-Interaktion sein.

Dass DOG1 ein lebensnotwendiges Protein ist, beweist ein DOG1-Knockout Versuch in Mäusen, der zur Folge hatte, dass die Tiere kurz nach der Geburt starben (Rock et al. 2008). Dazu kommt, dass DOG1 in vielen wichtigen Organen exprimiert wird, wie z.B. in Speicheldrüsen, Pankreas, Magen, Milchdrüsen und Luftröhren (Kunzelmann et al. 2011). Allerdings ist wenig bekannt über die genaue Funktion von DOG1 in humanen Geweben. Genexpressionsmuster-Analysen der UniGene-Datenbank zeigen aber ein ähnliches Expressionsmuster für DOG1 in Mensch und Maus

(Kunzelmann et al. 2009).

Unbestritten ist, dass die DOG1-Expression in GIST und in den interstitiellen Zellen von Cajal im Vergleich mit anderen Sarkomen sehr hoch ist (West et al. 2004; Espinosa et al. 2008). Eine amerikanische Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sowohl ein DOG1-Knockdown als auch die biochemische Inhibition von DOG1 das Wachstum von Kurzzeitkulturen Cajalzellen (ICCs) inhibiert (Stanich et al. 2011). Ebenfalls konnten sie eine Wachstumshemmung bzw. einen Zellzyklusarrest durch die Reduzierung des Chloridgehaltes im umgebenden Medium der ICCs erreichen. So liegt die Vermutung nahe, dass der anti-proliferative Effekt des DOG1-Knockdowns in den ICCs auf den reduzierten Chlorideinstrom zurückzuführen ist. In den GIST-Zelllinien hatte der DOG1-Knockdown jedoch keinen Einfluss auf die Proliferation oder auf den Zellzyklus (Abb. 18).

DOG1 wird außerdem nicht exklusiv in GIST, sondern auch in anderen Krebsarten exprimiert. Das Gen befindet sich auf Chromosom 11q13, einer Region, die in verschiedenen Krebsarten amplifiziert ist unter anderem in Brustkrebs, Blasenkrebs, Kopf-Hals-Karzinomen und Ösophaguskarzinomen (Akervall et al. 1995). Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen, die eine Amplifikation in dieser Region aufweisen, haben eine signifikant schlechtere Prognose. In diesem Zusammenhang wurde die Expression und Funktion von DOG1 in Plattenepithelkarzinom-Zelllinien von Ayoub *et al.* näher untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sich DOG1-positive Zelllinien leichter ablösen, weniger stark anhaften und invasiver sind. Mit Hilfe von Chloridkanalinhibitoren konnten diese malignen Eigenschaften der Plattenepithelkarzinom-Zelllinien inhibiert werden (Ayoub et al. 2010).

Auch Duvvuri und Kollegen konnten *in vitro* und *in vivo* eine Wachstumshemmung von Plattenepithelkarzinom-Zelllinien und Xenografttumoren durch einen DOG1-Knockdown beobachten, der mit einer erhöhten Aktivierung des MAPK-Signalwegs einherging (Duvvuri et al. 2012). Die Aktivierung der MAPK-Kaskade durch KIT ist eines der wichtigsten onkogenen Ereignisse in GIST, deshalb ist die MAPK-Expression in Imatinib-sensiblen humanen Tumoren, Zelllinien und auch in den Imatinib-sensiblen Xenografttumoren sehr hoch. Durch diese ohnehin schon sehr hohen Level der MAPK und pMAPK in GIST wird eine eventuelle zusätzliche

Aktivierung des MAPK-Signalweges durch einen DOG1-Knockdown in GIST kaum eine Rolle spielen und konnte auch nicht beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe von Genexpressions-Analysen mehrere verändert exprimierte Gene, die mit Proliferation und Überleben assoziiert sind, in den DOG1-negativen GIST-T1 Xenografttumoren identifiziert werden. Von den Kandidatengenen konnte allerdings nur die erhöhte Expression von IGFBP5, *Insulin-like growth factor-binding protein 5*, mittels qRT-PCR validiert werden (Abb. 23).

Interessanterweise konnten Transkriptom-Sequenzanalysen von der KIT- und DOG1-negativen GIST430B Sublinie einen 5000fachen Anstieg der IGFBP5-Transkripte im Vergleich zu der parentalen KIT- und DOG1-positiven Zelllinie zeigen. Im Gegensatz dazu zeigte die KIT- und DOG1-negative GIST882B Sublinie keine Veränderung der IGFBP5 Level, so wie die DOG1-negativen GIST882 Xenografttumoren keine Wachstumsinhibition zeigten (Abb. 21C). Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass IGFBP5 nicht in allen GIST eine Rolle spielt, aber sowohl in DOG1-negativen GIST-T1 als auch in DOG1-negativen GIST430B Zellen hoch reguliert wird.

Die Familie der IGF-Bindungsproteine besteht aus sechs unterschiedlichen IGFBPs, die eine hohe Affinität für die IGFs (Insulin-like growth factors, insulinähnliche Wachstumsfaktoren) haben. Eine veränderte IGFBP5-Expression ist sowohl für Brustkrebs, Ovarialkarzinom und auch für das Retinoblastom beschrieben (Ahn et al. 2010; Walker et al. 2007; Xu et al. 2010). Die Überexpression von IGFBP5 bewirkt eine indirekte Inhibition des IGF-Signalweges. Die beiden Liganden des IGF1-Rezeptors, IGF1 und IGF2, werden vermehrt von IGFBP5-Proteinen gebunden und können so den IGF1-Rezeptor nicht aktivieren (Beattie et al. 2006). Es wurde außerdem bereits gezeigt, dass die Überexpression von IGFBP5 das Tumorwachstum und die Metastasierung in humanen Osteosarkomen vermindert (Su et al. 2011). In einem Ovarialkarzinom-Xenograftmodell verursachte eine Überexpression von IGFBP5 ebenfalls eine Hemmung des Tumorwachstums, die mit einer verminderten Vaskularisierung des Xenografttumors erklärt wurde (Rho et al. 2008). Eine Störung der Tumorangiogenese könnte auch bei den GIST-T1 Xenografttumoren vorliegen und böte eine gute Erklärung der abweichenden *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse dieser Arbeit. Ausblickend könnte diese Hypothese z.B. mit

Hilfe von CAM (chorio-allantoic membrane)-Assays überprüft werden.

Die Überexpression des vielversprechenden Kandidatengens IGFBP5 zeigte weder *in vitro* noch *in vivo* Effekte auf die Proteinexpression von DOG1 oder die Zellproliferation. Der Nachweis der Überexpression konnte nur mittels qRT-PCR erfolgen, weil keine geeigneten Antikörper für Western Blot-Analysen oder IHC-Färbungen zur Verfügung stehen. Ob eine Überexpression von IGFBP5 auch auf Proteinebene vorlag konnte also nicht bestätigt werden, sodass die negativen Ergebnisse eventuell auf das Fehlen eines funktionellen IGFBP5-Proteins zurückzuführen sind.

Die hohen Expressionslevel von DOG1 in GIST und die Coexpression mit KIT machen DOG1 zu einer interessanten möglichen Zielstruktur. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown von DOG1 zu einer signifikanten Wachstumshemmung von GIST-Tumoren *in vivo* führt. Diese Daten weisen auf ein therapeutisches Potenzial von DOG1 bei GIST hin.

5. Zusammenfassung

Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) sind die häufigsten mesenchymalen Tumoren im Gastrointestinaltrakt. Charakteristisch für GIST sind aktivierende Mutationen der Typ-III-Rezeptortyrosinkinasen KIT oder Platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR- α). Bei etwa 85 % aller Patienten finden sich Mutationen in diesen Genen. Trotz der klinischen Erfolge mit KIT-Inhibitoren entwickeln über 80 % aller Patienten im Verlauf eine Resistenz und versterben an der Erkrankung. Klinisch manifestiert sich die erworbene Resistenz als noduläres Wachstum resistenter Klone, die meist eine sekundäre Mutation von KIT aufweisen. Die Entwicklung von Salvage-Therapien wird durch die große genomische Heterogenität auch innerhalb einzelner Patienten erschwert.

In dieser Arbeit konnten durch systematische Kultivierung von Frishtumorgewebe und Selektion bestehender Zelllinien verschiedene einzigartige GIST-Linien etabliert werden. Dazu zählen die erste Neurofibromatose-assoziierte GIST-Linie sowie die erste GIST-Linie mit der klinisch Behandlungsrefraktären KIT D816 Sekundär-Mutation. Zudem wurde ein einzigartiges isogenes Imatinib-Resistenz Modell (*in vitro* und *in vivo*) generiert, welches die klinisch relevante, komplexe genomische Heterogenität von GIST und die klonale Evolution resistenter Klone rekapituliert. Mithilfe dieses Modells wird die Entwicklung von Behandlungskombinationen und Dosierungsschemata ermöglicht, die die Ausbildung von resistenten Klonen verhindern oder deutlich verzögern könnten.

Überdies wurde erstmals DOG1, einen der wichtigsten immunhistochemischen Marker von GIST in der pathologischen Praxis, funktionell im zellulären Kontext von GIST untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Ausschaltung von DOG1 das Wachstum von GIST *in vivo* hemmt und somit eine mögliche therapeutische Zielstruktur darstellt.

5.1 Summary (Zusammenfassung in englischer Sprache)

Gastrointestinal stromal tumors (GIST) represent the most common mesenchymal malignancy of the gastrointestinal tract and are characterized by activating mutations of the receptor tyrosine kinases KIT or PDGFRA. About 85% of GIST patients have such mutations.

Despite the clinical success of KIT-inhibitors 80% of the patients eventually progress and die of their disease. Acquired resistance to KIT-inhibitors typically manifests as nodular outgrowth of GIST clones that harbor secondary KIT-mutations. Development of salvage therapies is complicated by a marked genomic heterogeneity of secondary mutations even within single patients.

In this project different unique GIST-lines were established by systematic cultivation of fresh tumor tissues and systematic selection of an existing cell line. This includes the first neurofibromatosis-associated GIST line worldwide and the first GIST line harboring the clinically important secondary KIT mutation D816.

Moreover, a unique isogenic model of Imatinib-resistance was generated (*in vitro* and *in vivo*). This model recapitulates the clinical complexity of genomic heterogeneity and clonal evolution. This may help to develop treatment combinations and schedules that may avoid or delay acquired resistance.

Furthermore the functional relevance of DOG1, one of the most pathologically important immunohistochemical marker of GIST, was proven for the first time. This project has shown that the functional inhibition of DOG1 leads to a delayed tumor growth *in vivo* therefore DOG1 could be a potential therapeutic target in GIST.

6. Abkürzungsverzeichnis

A.dest.	Aqua destillata – destilliertes Wasser
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BPE	Bovine Pituitary Extract
CNV	<i>copy number variation</i> (Kopienzahlvariation)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
DTT	Dithiothreitol
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
et al.	et alii oder et aliae, „und andere“
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (fetales Kälberserum)
ICC	Cajalzellen bzw. Interstitielle Zellen von Cajal
IGFBP5	Insulin-like growth factor-binding protein 5
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS-T	Phosphate Buffered Saline Tween-20
PI	Propidiumiodid
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> PCR

SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Einzelnukleotidpolymorphismus)
SRB	Sulforhodamin B
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung des dimersierten KIT-Rezeptors.....	6
Abb. 2	Nach Phosphorylierung von KIT werden verschiedene Signalwege aktiviert, die zur Proliferation der Zelle führen. Über die PI3-Kinase wird unter anderem die AKT-Kinase (Proteinkinase B; PKB) aktiviert und über den Ras/Raf Signalweg wird die MAPK-Kaskade in Gang gesetzt (Linnekin 1999).....	7
Abb. 3	Schematische Darstellung des Chloridflux durch CaCCs.....	13
Abb. 4	Schematische Darstellung des CaCC DOG1.....	14
Abb. 5	Immunhistochemische Analyse eines GIST-Xenografttumors vom Patienten NS72. Der Tumor zeigt eine typische spindelförmige Morphologie, enthält viele Mitosen (A) und ist sowohl KIT-positiv (B) als auch DOG1-positiv (C).....	39
Abb. 6	Auszug aus dem Chromatogramm der Sequenzanalyse des AZ38-Xenografttumors. Jeder der vier farbigen Peaks steht für ein Nukleotid der DNA: A (Adenin), C (Cytosin), G (Guanin), T (Thymin). (A) Durch einen heterozygoten Nukleotidaustausch von Adenin nach Thymin in der DNA wird auf Aminosäureebene Valin (V) durch Asparaginsäure (D) ersetzt und (B) durch einen heterozygoten Nukleotidaustausch von Cytosin nach Thymin in der DNA wird auf Aminosäureebene Asparaginsäure (D) durch Glycin (G) ersetzt.....	41
Abb. 7	Exemplarische Darstellung von Chromosom 3 der SNP-Array Analyse.	42

Abb. 8	Inhibition von KIT und KIT-abhängiger Signalwege durch Regorafenib in AZ38-Zellen (A). Zytotoxizitäts-Assay nach 3 Tagen Inkubation mit ansteigenden Dosierungen von Regorafenib (B).....	43
Abb. 9	<i>In vivo</i> Xenograft-Wachstumskurven von GIST-T1 und GIST882 Zellen mit und ohne Imatinib-Behandlung.....	45
Abb. 10	<i>In vivo</i> Xenograft-Wachstumskurven der vier verschiedenen GIST-T1 Sublinien mit und ohne kontinuierlicher Imatinib-Behandlung über das Trinkwasser.....	46
Abb. 11	Immunhistochemische Analyse von GIST-T1 Xenografttumoren mit und ohne Imatinib-Behandlung. Gewebeschnitte von Paraffin-fixierten Tumoren wurden mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (A, D) morphologisch untersucht. Der spezifische Nachweis von KIT erfolgte durch eine immunhistochemische Färbung mit einem anti-human KIT-Antikörper (B, E). Die Ki67-Färbung diente als Proliferationsnachweis (C, F).....	47
Abb. 12	Auszug aus dem Chromatogramm der Sequenzanalyse der neuen Sublinien von GIST-T1. Jeder der vier farbigen Peaks steht für ein Nukleotid der DNA: A (Adenin), C (Cytosin), G (Guanin), T (Thymin)...	48
Abb. 13	IC ₅₀ -Werte von drei Kinase-Inhibitoren getestet in allen fünf GIST-T1 Zelllinien (A). Untersuchung der Proteinexpression mittels Western Blot (B).....	49
Abb. 14	Dotplot-Graph von vier isogenen GIST-T1 Zelllinien nach Durchflusszytometrischer Analyse (A). Immunhistochemische Analyse von GFP bei einem GIST-T1/GIST-T1 ^{D816E} -Xenografttumor (B). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von enzymatisch verdauten Xenografttumoren ohne (C) und mit (D) kontinuierlicher Imatinib-Behandlung über das Trinkwasser.....	50
Abb. 15	Vergleich der Proteinexpression der parentalen KIT-positiven GIST-Zelllinien und der dazugehörigen KIT-negativen Sublinien (A). Spezifische Inhibition von KIT mit 1 µM Imatinib und unspezifische Kinase-Hemmung mit 0,5 µM 17AAG (B).....	52

Abb. 16	Vergleich der Proteinexpression der parentalen GIST-Zelllinie, der dazugehörigen Scrambled-Kontrollzelllinie (SCR) und shRNA-Zelllinie von GIST-T1 und GIST882 um den DOG1-Knockdown zu bestätigen.	53
Abb. 17	Whole-Cell-Patch-Clamp-Messungen der Scrambled-Kontrollen (SCR) und der DOG1-Knockdown Zellen von GIST-T1 und GIST882.....	54
Abb. 18	Zellproliferationsuntersuchungen über Bromdesoxyuridin (BrdU)-Inkorporation der parentalen GIST-Zelllinien (KTR), der dazugehörigen Scrambled-Kontrollzelllinien (SCR) und shRNA-Zelllinien von GIST-T1 (A) und GIST882 (B).....	54
Abb. 19	Zytotoxizitäts-Assay nach 3-Tagen mit ansteigenden Konzentrationen von Imatinib (10 nM – 10 µM) der parentalen GIST-Zelllinien, der dazugehörigen Scrambled-Kontrollzelllinien und shRNA-Zelllinien von GIST-T1 (A) und GIST882 (B).....	55
Abb. 20	Dosis-Wirkungskurven nach 3-Tagen mit ansteigenden Konzentrationen von Nifluminsäure (NAC), 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoat (NPPB) und A01 von den Scrambled-Kontrollzelllinien und den DOG1shRNA-Zelllinien von GIST-T1 und GIST882.....	56
Abb. 21	<i>In vivo</i> Wachstumskurven der Scrambled-Xenografts und der shRNA-DOG1 Xenografts von GIST-T1 (A), GIST430 (B) und GIST882 (C)...	57
Abb. 22	Immunhistochemische Analyse von GIST-T1 und GIST882 Xenografttumoren mit und ohne DOG1-Knockdown. Gewebeschnitte von Paraffin-fixierten Tumoren wurden mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung morphologisch untersucht. Der spezifische Nachweis von DOG1 und KIT erfolgte durch immunhistochemische Färbungen mit anti-humanen Antikörpern. Die Ki67-Färbung diente als Proliferationsnachweis.....	58
Abb. 23	Validierung der Kandidatengene des Genexpressions-Arrays mittels quantitativer Real-Time-PCR.....	62
Abb. 24	Vergleich der transkriptionellen Regulation von IGFBP5 in DOG1-negativen GIST-T1 und GIST882 Xenografttumoren mittels quantitativer Real-Time-PCR.....	63

Abb. 25	Nachweis der lentiviralen Überexpression von IGFBP5 mittels quantitativer Real-Time-PCR.....	64
Abb. 26	Zellzyklusanalyse von IGFBP5-überexprimierenden GIST-T1 Zellen	64
Abb. 27	Imatinib Dosis-Wirkungsmessungen nach drei Tagen.....	65
Abb. 28	<i>In vivo</i> Wachstumskinetiken von GIST-T1 Xenografttumoren mit IGFBP5-Überexpression und der Leervektorkontrolle.....	65
Abb. 29	Nachweis der IGFBP5-Überexpression in den GIST-T1 Xenografttumoren mittels quantitativer Real-Time-PCR.....	66
Abb. 30	Schematische Darstellung verschiedener Behandlungsstrategien basierend auf dem etablierten Xenograftmodell der genomischen Heterogenität. In der obersten Reihe sind die verschiedenen Mischverhältnisse der Zellsuspensionen zum Zeitpunkt der Injektion abgebildet. Die Spalten A bis E zeigen erwartete Ergebnisse verschiedener Behandlungsverläufe in verschiedenen klinische Situationen (Erstdiagnose, ein bzw. zwei Jahre nach Behandlung). Die Imatinib-sensitiven Tumorzellen sind grün dargestellt, die Imatinib-resistenten Tumorzellen rot, blau und grau.....	71

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Auflistung aller subkutan transplantierten Patientenproben mit anonymisierter Patienten-ID, KIT-Mutationsstatus, Tumorigenität und Passagierbarkeit.....	39
Tab. 2	Auflistung aller Wachstumscharakteristika der AZ38-Xenografttumoren.	40
Tab. 3	Auflistung aller subkutan transplantierten GIST-Zelllinien.....	44
Tab. 4	Auflistung der 20 am stärksten veränderten Gene in den DOG1-negativen GIST-T1 Xenografttumoren im Vergleich zu den Scrambled-Xenografttumoren.....	59
Tab. 5	Auflistung der 20 am stärksten veränderten Gene in der DOG1-negativen GIST-T1 Zelllinie im Vergleich zu der Scrambled-Kontrolle.	60

9. Literaturverzeichnis

1. Abraham SC, Krasinskas AM, Hofstetter WL, Swisher SG and Wu TT. (2007). *Am J Surg Pathol*, **31**, 1629-1635.
2. Ahn BY, Elwi AN, Lee B, Trinh DL, Klimowicz AC, Yau A, Chan JA, Magliocco A and Kim SW. (2010). *Cancer Res*, **70**, 3013-3019.
3. Akervall JA, Jin Y, Wennerberg JP, Zatterstrom UK, Kjellen E, Mertens F, Willen R, Mandahl N, Heim S and Mitelman F. (1995). *Cancer*, **76**, 853-859.
4. Ayoub C, Wasyluk C, Li Y, Thomas E, Marisa L, Robe A, Roux M, Abecassis J, de RA and Wasyluk B. (2010). *Br J Cancer*, **103**, 715-726.
5. Bajor J. (2009). *Orv Hetil*, **150**, 149-153.
6. Bauer S, Duensing A, Demetri GD and Fletcher JA. (2007). *Oncogene*, **26**, 7560-7568.
7. Bauer S, Hartmann JT, de WM, Lang H, Grabellus F, Antoch G, Niebel W, Erhard J, Ebeling P, Zeth M, Taeger G, Seeber S, Flasshove M and Schutte J. (2005). *Int J Cancer*, **117**, 316-325.
8. Bauer S, Yu LK, Demetri GD and Fletcher JA. (2006). *Cancer Res*, **66**, 9153-9161.
9. Beattie J, Allan GJ, Lochrie JD and Flint DJ. (2006). *Biochem J*, **395**, 1-19.
10. Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu FH, Bergold PJ, Lederman L, Snyder HW, Jr., Brodeur D, Zuckerman EE and Hardy WD. (1986). *Nature*, **320**, 415-421.
11. Blanke CD, Demetri GD, von MM, Heinrich MC, Eisenberg B, Fletcher JA, Corless CL, Fletcher CD, Roberts PJ, Heinz D, Wehre E, Nikolova Z and Joensuu H. (2008). *J Clin Oncol*, **26**, 620-625.
12. Blay JY, Bonvalot S, Casali P, Choi H, Debiec-Richter M, Dei Tos AP, Emile JF, Gronchi A, Hogendoorn PC, Joensuu H, Le CA, McClure J, Maurel J, Nupponen N, Ray-Coquard I, Reichardt P, Sciot R, Stroobants S, van GM, Van OA and Demetri GD. (2005). *Ann Oncol*, **16**, 566-578.
13. Bradford MM. (1976). *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
14. Chen H, Ordog T, Chen J, Young DL, Bardsley MR, Redelman D, Ward SM and Sanders KM. (2007). *Physiol Genomics*, **31**, 492-509.
15. Chmielecki J, Foo J, Oxnard GR, Hutchinson K, Ohashi K, Somwar R, Wang L, Amato KR, Arcila M, Sos ML, Socci ND, Viale A, de SE, Ginsberg MS, Thomas RK, Kris MG, Inoue A, Ladanyi M, Miller VA, Michor F and Pao W. (2011). *Sci Transl Med*, **3**, 90ra59.

16. Corless CL, Barnett CM and Heinrich MC. (2011a). *Nat Rev Cancer*, **11**, 865-878.
17. Corless CL, Barnett CM and Heinrich MC. (2011b). *Nat Rev Cancer*, **11**, 865-878.
18. Corless CL, Fletcher JA and Heinrich MC. (2004). *J Clin Oncol*, **22**, 3813-3825.
19. Debiec-Rychter M, Cools J, Dumez H, Sciot R, Stul M, Mentens N, Vranckx H, Wasag B, Prenen H, Roesel J, Hagemeijer A, Van OA and Marynen P. (2005). *Gastroenterology*, **128**, 270-279.
20. Dematteo RP, Heinrich MC, El-Rifai WM and Demetri G. (2002). *Hum Pathol*, **33**, 466-477.
21. Dematteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM and Brennan MF. (2000). *Ann Surg*, **231**, 51-58.
22. Demetri GD, Reichardt P, Kang YK, Blay JY, Rutkowski P, Gelderblom H, Hohenberger P, Leahy M, von MM, Joensuu H, Badalamenti G, Blackstein M, Le CA, Schoffski P, Maki RG, Bauer S, Nguyen BB, Xu J, Nishida T, Chung J, Kappeler C, Kuss I, Laurent D and Casali PG. (2013). *Lancet*, **381**, 295-302.
23. Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, McArthur G, Judson IR, Heinrich MC, Morgan JA, Desai J, Fletcher CD, George S, Bello CL, Huang X, Baum CM and Casali PG. (2006). *Lancet*, **368**, 1329-1338.
24. Demetri GD, von MM, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD and Joensuu H. (2002). *N Engl J Med*, **347**, 472-480.
25. Duvvuri U, Shiwarski DJ, Xiao D, Bertrand C, Huang X, Edinger RS, Rock JR, Harfe BD, Henson BJ, Kunzelmann K, Schreiber R, Seethala RS, Egloff AM, Chen X, Lui VW, Grandis JR and Gollin SM. (2012). *Cancer Res*, **72**, 3270-3281.
26. Espinosa I, Lee CH, Kim MK, Rouse BT, Subramanian S, Montgomery K, Varma S, Corless CL, Heinrich MC, Smith KS, Wang Z, Rubin B, Nielsen TO, Seitz RS, Ross DT, West RB, Cleary ML and van de Rijn M. (2008). *Am J Surg Pathol*, **32**, 210-218.
27. Ferner RE. (2007). *Lancet Neurol*, **6**, 340-351.
28. Ferrera L, Caputo A, Ubbi I, Bussani E, Zegarra-Moran O, Ravazzolo R, Pagani F and Galletta LJ. (2009). *J Biol Chem*, **284**, 33360-33368.
29. Fried J, Perez AG and Clarkson BD. (1976). *J Cell Biol*, **71**, 172-181.

30. Gajiwala KS, Wu JC, Christensen J, Deshmukh GD, Diehl W, DiNitto JP, English JM, Greig MJ, He YA, Jacques SL, Lunney EA, McTigue M, Molina D, Quenzer T, Wells PA, Yu X, Zhang Y, Zou A, Emmett MR, Marshall AG, Zhang HM and Demetri GD. (2009). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 1542-1547.
31. Gomez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Bardsley MR, Lorincz A, Pozo MJ, Pasricha PJ, van de Rijn M, West RB, Sarr MG, Kendrick ML, Cima RR, Dozois EJ, Larson DW, Ordog T and Farrugia G. (2009). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **296**, G1370-G1381.
32. Graham FL and van der Eb AJ. (1973). *Virology*, **52**, 456-467.
33. Gunawan B, von HA, Sander B, Schulten HJ, Haller F, Langer C, Armbrust T, Bollmann M, Gasparov S, Kovac D and Fuzesi L. (2007). *J Pathol*, **211**, 463-470.
34. Gupta A, Roy S, Lazar AJ, Wang WL, McAuliffe JC, Reynoso D, McMahon J, Taguchi T, Floris G, Debiec-Rychter M, Schoffski P, Trent JA, Debnath J and Rubin BP. (2010). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 14333-14338.
35. Hartzell C, Putzier I and Arreola J. (2005). *Annu Rev Physiol*, **67**, 719-758.
36. Hehlmann R, Hochhaus A and Baccarani M. (2007). *Lancet*, **370**, 342-350.
37. Heinrich MC, Corless CL, Blanke CD, Demetri GD, Joensuu H, Roberts PJ, Eisenberg BL, von MM, Fletcher CD, Sandau K, McDougall K, Ou WB, Chen CJ and Fletcher JA. (2006). *J Clin Oncol*, **24**, 4764-4774.
38. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von MM, Joensuu H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele AD, Druker BJ, Kiese B, Eisenberg B, Roberts PJ, Singer S, Fletcher CD, Silberman S, Dimitrijevic S and Fletcher JA. (2003a). *J Clin Oncol*, **21**, 4342-4349.
39. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD and Fletcher JA. (2003b). *Science*, **299**, 708-710.
40. Heinrich MC, Maki RG, Corless CL, Antonescu CR, Harlow A, Griffith D, Town A, McKinley A, Ou WB, Fletcher JA, Fletcher CD, Huang X, Cohen DP, Baum CM and Demetri GD. (2008a). *J Clin Oncol*, **26**, 5352-5359.
41. Heinrich MC, Marino-Enriquez A, Presnell A, Donsky RS, Griffith DJ, McKinley A, Patterson J, Taguchi T, Liang CW and Fletcher JA. (2012). *Mol Cancer Ther*, **11**, 1770-1780.
42. Heinrich MC, Owzar K, Corless CL, Hollis D, Borden EC, Fletcher CD, Ryan CW, von MM, Blanke CD, Rankin C, Benjamin RS, Bramwell VH, Demetri GD, Bertagnolli MM and Fletcher JA. (2008b). *J Clin Oncol*, **26**, 5360-5367.
43. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano

- K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad TG, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y and Kitamura Y. (1998). *Science*, **279**, 577-580.
44. Hostein I, Faur N, Primois C, Boury F, Denard J, Emile JF, Bringuier PP, Scoazec JY and Coindre JM. (2010). *Am J Clin Pathol*, **133**, 141-148.
 45. Janeway KA, Kim SY, Lodish M, Nose V, Rustin P, Gaal J, Dahia PL, Liegl B, Ball ER, Raygada M, Lai AH, Kelly L, Hornick JL, O'Sullivan M, de Krijger RR, Dinjens WN, Demetri GD, Antonescu CR, Fletcher JA, Helman L and Stratakis CA. (2011). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 314-318.
 46. Joensuu H, Eriksson M, Sundby HK, Hartmann JT, Pink D, Schutte J, Ramadori G, Hohenberger P, Duyster J, Al-Batran SE, Schlemmer M, Bauer S, Wardelmann E, Sarlomo-Rikala M, Nilsson B, Sihto H, Monge OR, Bono P, Kallio R, Vehtari A, Leinonen M, Alvegard T and Reichardt P. (2012). *JAMA*, **307**, 1265-1272.
 47. Johansson P, Pavey S and Hayward N. (2007). *Pigment Cell Res*, **20**, 216-221.
 48. Kawanowa K, Sakuma Y, Sakurai S, Hishima T, Iwasaki Y, Saito K, Hosoya Y, Nakajima T and Funata N. (2006). *Hum Pathol*, **37**, 1527-1535.
 49. Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F and Meis-Kindblom JM. (1998). *Am J Pathol*, **152**, 1259-1269.
 50. Kunzelmann K, Kongsuphol P, Aldehni F, Tian Y, Ousingsawat J, Warth R and Schreiber R. (2009). *Cell Calcium*, **46**, 233-241.
 51. Kunzelmann K, Tian Y, Martins JR, Faria D, Kongsuphol P, Ousingsawat J, Thevenod F, Roussa E, Rock J and Schreiber R. (2011). *Pflugers Arch*, **462**, 195-208.
 52. Laemmli UK. (1970). *Nature*, **227**, 680-685.
 53. Liegl B, Hornick JL, Corless CL and Fletcher CD. (2009). *Am J Surg Pathol*, **33**, 437-446.
 54. Linnekin D. (1999). *Int J Biochem Cell Biol*, **31**, 1053-1074.
 55. Loveland KL and Schlatt S. (1997). *J Endocrinol*, **153**, 337-344.
 56. Mackenzie MA, Jordan SA, Budd PS and Jackson IJ. (1997). *Dev Biol*, **192**, 99-107.
 57. Maeyama H, Hidaka E, Ota H, Minami S, Kajiyama M, Kuraishi A, Mori H, Matsuda Y, Wada S, Sodeyama H, Nakata S, Kawamura N, Hata S, Watanabe M, Iijima Y and Katsuyama T. (2001). *Gastroenterology*, **120**, 210-215.
 58. Miettinen M, Fetsch JF, Sobin LH and Lasota J. (2006). *Am J Surg Pathol*, **30**,

90-96.

59. Miettinen M and Lasota J. (2001). *Virchows Arch*, **438**, 1-12.
60. Miettinen M, Wang ZF and Lasota J. (2009). *Am J Surg Pathol*, **33**, 1401-1408.
61. Miwa S, Nakajima T, Murai Y, Takano Y and Sugiyama T. (2008). *J Gastroenterol*, **43**, 531-537.
62. Mol CD, Dougan DR, Schneider TR, Skene RJ, Kraus ML, Scheibe DN, Snell GP, Zou H, Sang BC and Wilson KP. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 31655-31663.
63. Morton CL and Houghton PJ. (2007). *Nat Protoc*, **2**, 247-250.
64. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H. (1992). *Biotechnology*, **24**, 17-27.
65. Nakai N, Ishikawa T, Nishitani A, Liu NN, Shincho M, Hao H, Isozaki K, Kanda T, Nishida T, Fujimoto J and Hirota S. (2008). *J Pathol*, **214**, 302-311.
66. Namkung W, Phuan PW and Verkman AS. (2011). *J Biol Chem*, **286**, 2365-2374.
67. Patil S and Chamberlain RS. (2012). *Oncologist*, **17**, 101-116.
68. Rho SB, Dong SM, Kang S, Seo SS, Yoo CW, Lee DO, Woo JS and Park SY. (2008). *Carcinogenesis*, **29**, 2106-2111.
69. Rock JR, Futtner CR and Harfe BD. (2008). *Dev Biol*, **321**, 141-149.
70. Rubin BP, Antonescu CR, Scott-Browne JP, Comstock ML, Gu Y, Tanas MR, Ware CB and Woodell J. (2005). *Cancer Res*, **65**, 6631-6639.
71. Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, Hibbard MK, Chen CJ, Xiao S, Tuveson DA, Demetri GD, Fletcher CD and Fletcher JA. (2001). *Cancer Res*, **61**, 8118-8121.
72. Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. (1992). *Biotechnology*, **24**, 104-108.
73. Schroeder BC, Cheng T, Jan YN and Jan LY. (2008). *Cell*, **134**, 1019-1029.
74. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J and Sawyers CL. (2002). *Cancer Cell*, **2**, 117-125.
75. Shuman S. (1994). *J Biol Chem*, **269**, 32678-32684.
76. Simon S, Grabellus F, Ferrera L, Galiotta L, Schwindenhammer B, Muhlenberg T, Taeger G, Eilers G, Treckmann J, Breitenbuecher F, Schuler M, Taguchi T, Fletcher JA and Bauer S. (2013). *Cancer Res*, **73**, 3661-3670.

77. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S and Boyd MR. (1990). *J Natl Cancer Inst*, **82**, 1107-1112.
78. Sommer G, Agosti V, Ehlers I, Rossi F, Corbacioglu S, Farkas J, Moore M, Manova K, Antonescu CR and Besmer P. (2003). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6706-6711.
79. Stanich JE, Gibbons SJ, Eisenman ST, Bardsley MR, Rock JR, Harfe BD, Ordog T and Farrugia G. (2011). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **301**, G1044-G1051.
80. Stephan AB, Shum EY, Hirsh S, Cygnar KD, Reisert J and Zhao H. (2009). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 11776-11781.
81. Stratakis CA and Carney JA. (2009). *J Intern Med*, **266**, 43-52.
82. Su Y, Wagner ER, Luo Q, Huang J, Chen L, He BC, Zuo GW, Shi Q, Zhang BQ, Zhu G, Bi Y, Luo J, Luo X, Kim SH, Shen J, Rastegar F, Huang E, Gao Y, Gao JL, Yang K, Wietholt C, Li M, Qin J, Haydon RC, He TC and Luu HH. (2011). *Oncogene*, **30**, 3907-3917.
83. Taguchi T, Sonobe H, Toyonaga S, Yamasaki I, Shuin T, Takano A, Araki K, Akimaru K and Yuri K. (2002). *Lab Invest*, **82**, 663-665.
84. Tamborini E, Priol S, Negri T, Lagonigro MS, Miselli F, Greco A, Gronchi A, Casali PG, Ferrone M, Fermeiglia M, Carbone A, Pierotti MA and Pilotti S. (2006). *Oncogene*, **25**, 6140-6146.
85. Towbin H, Staehelin T and Gordon J. (1979). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
86. Tuveson DA, Willis NA, Jacks T, Griffin JD, Singer S, Fletcher CD, Fletcher JA and Demetri GD. (2001). *Oncogene*, **20**, 5054-5058.
87. Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, LeCesne A, Reichardt P, Blay JY, Issels R, Van OA, Hogendoorn PC, van GM, Bertulli R and Judson I. (2004). *Lancet*, **364**, 1127-1134.
88. Walker G, MacLeod K, Williams AR, Cameron DA, Smyth JF and Langdon SP. (2007). *Clin Cancer Res*, **13**, 1438-1444.
89. Ward SM, Burns AJ, Torihashi S and Sanders KM. (1994). *J Physiol*, **480 (Pt 1)**, 91-97.
90. Wardelmann E, Thomas N, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Speidel N, Buttner R, Bihl H, Leutner CC, Heinicke T and Hohenberger P. (2005). *Lancet Oncol*, **6**, 249-251.
91. Wendehenne D, Lamotte O, Frachisse JM, Barbier-Brygoo H and Pugin A.

(2002). *Plant Cell*, **14**, 1937-1951.

92. West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, Zhu S, Ball CA, Nielsen TO, Patel R, Goldblum JR, Brown PO, Heinrich MC and van de Rijn M. (2004). *Am J Pathol*, **165**, 107-113.
93. Xu XL, Lee TC, Offor N, Cheng C, Liu A, Fang Y, Jhanwar SC, Abramson DH and Cobrinik D. (2010). *Am J Pathol*, **177**, 424-435.
94. Yang J, Du X, Lazar AJ, Pollock R, Hunt K, Chen K, Hao X, Trent J and Zhang W. (2008a). *Cancer*, **113**, 1532-1543.
95. Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, Park SP, Lee J, Lee B, Kim BM, Raouf R, Shin YK and Oh U. (2008b). *Nature*, **455**, 1210-1215.
96. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U and Ullrich A. (1987). *EMBO J*, **6**, 3341-3351.
97. Ylipaa A, Hunt KK, Yang J, Lazar AJ, Torres KE, Lev DC, Nykter M, Pollock RE, Trent J and Zhang W. (2011). *Cancer*, **117**, 380-389.
98. Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, Schlessinger J and Kong XP. (2000). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7732-7737.

10. Anhang

10.1 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. S. Bauer für die intensive, geduldige und kompetente Betreuung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt Prof. Dr. M. Schuler für sein Interesse an meiner Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft.

Allen Mitgliedern der AG translationale Sarkomforschung möchte ich für das freundschaftliche Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft danken.

Meinem Ehemann danke ich ganz besonders für sein Verständnis und seine Geduld.

10.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Susanne Grunewald (geb. Simon)
Geburtsdatum: 17. September 1982
Geburtsort: Essen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotion

2009- 2014 Promotion, Universität Duisburg-Essen in der Inneren Klinik
(Tumorforschung), Arbeitsgruppe „translationale
Sarkomforschung“ (Prof. Dr. S. Bauer)

Studium

2002- 2008 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum

Abschluss: Diplom-Biologin

Thema der Diplomarbeit: „ Charakterisierung der Gal4-
Enhancertrap-Linie KI78 der Taufliege Drosophila melanogaster“

Schulausbildung

1993-2002 B.M.V.-Schule in Essen

1989-1993 Schule an der Waldlehne in Essen

Veröffentlichungen

Wissenschaftliche Publikationen:

Henze J, Muhlenberg T, **Simon S**, Grabellus F, Rubin B, Taeger G, Schuler M, Treckmann J, Debiec-Rychter M, Taguchi T, Fletcher JA and Bauer S. (2012). *PLoS One*, **7**, e37776.

Simon S, Grabellus F, Ferrera L, Galiotta L, Schwindenhammer B, Muhlenberg T, Taeger G, Eilers G, Treckmann J, Breitenbuecher F, Schuler M, Taguchi T, Fletcher JA and Bauer S. (2013). *Cancer Res*, **73**, 3661-3670.

Bauer S, Hilger RA, Muhlenberg T, Grabellus F, Nagarajah J, Hoiczky M, Reichardt A, Ahrens M, Reichardt P, **Grunewald S**, Scheulen ME, Pustowka A, Bock E, Schuler M and Pink D. (2014). *Br J Cancer*.

Tagungsbeiträge (Poster und Vorträge):

Henze J, Mühlenberg T, **Simon S**, Fletcher JA, Schuler M, Bauer S
Targeting the MDM2/p53 pathway in gastrointestinal stromal tumors: Therapeutic potential.
AACR-NCI-EORTC International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics. Abstract C154, Boston, USA (2009)

Simon S, Grabellus F, Taeger G, Treckmann J, Schuler M, Fletcher JA, Bauer S
Validation of xenograft-based in-vivo models of gastrointestinal stromal tumors.
Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Posternummer: P849, Basel, Schweiz (2011)

Simon S, Ferrera L, Galiotta L, Grabellus F, Mühlenberg T, Breitenbücher F, Schuler M, Fletcher JA, Bauer S
Funktionelle Charakterisierung von DOG1 in Gastrointestinal Stromal Tumoren (GIST).
Sarkomkonferenz, Vortrag, Berlin, Deutschland (2012)

Simon S, Ferrera L, Galiotta L, Grabellus F, Mühlenberg T, Breitenbücher F, Schuler M, Fletcher JA, Bauer S
Functional characterization of DOG1 in Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST).
AACR 103rd Annual Meeting, Abstract # 1824, Chicago, USA (2012)

Grunewald S, Mühlenberg T, Ketzer J, Backs M, Rubin B, Schuler M, Fletcher JA, Bauer S
Sekundäre KIT-Mutationen hemmen das Zellwachstum von GIST bei fehlendem Selektionsdruck von Imatinib.
Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Vortragsnummer: V607, Wien, Österreich (2013)

10.3 Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Systematische Entwicklung von GIST-Modellen und Untersuchung von DOG1 bei GIST“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Susanne Grunewald befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____
Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____
Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____
Unterschrift des Doktoranden